

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
des Kindes und Jugendalters

***Analyse des Fettsäureamidhydrolasegens bei extrem
adipösen Kindern und Jugendlichen***

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Melanie Wandolski
aus Mülheim an der Ruhr

2010

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting
1. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. A. Hinney
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. W. Siffert

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juni 2010

Publikation

Müller, T.D., Brönner, G., Wandolski, M., Carrie, J., Nguyen, T.T., Greene, B.H., Scherag, A., Grallert, H., Vogel, C.I., Scherag, S., Rief, W., Wichmann, H.E., Illig, T., Schaefer, H., Hebebrand, J., Hinney, A. (2010):
Mutation screen and association studies for the fatty acid amide hydrolase (FAAH) gene and early onset and adult obesity.
BMC Med Genet. 11, 2.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	4
1 Einleitung	8
1.1 Epidemiologie der Adipositas	8
1.2 Definition und Diagnose der Adipositas	9
1.3 Folge- und Begleiterkrankungen der Adipositas	11
1.4 Therapie der Adipositas	11
1.5 Ätiologie der Adipositas	13
1.5.1 Syndromale Formen der Adipositas	13
1.5.2 Monogene Formen der Adipositas	13
1.5.3 Polygene Formen der Adipositas	15
1.5.4 Sekundäre Formen der Adipositas	17
1.6 Grundlagen der Gewichtsregulation	18
1.6.1 Zentrale Regelkreise	18
1.6.1.1 Anorexigene Neurotransmitter	18
1.6.1.2 Orexigene Neurotransmitter	19
1.6.2 Periphere Regulation der Nahrungsaufnahme	20
1.6.2.1 Langfristige Aufrechterhaltung der Energiehomöostase	21
1.6.2.2 Kurzzeitige Regulation von Hunger und Sättigung	22
1.7 Das endogene Cannabinoidsystem	24
1.7.1 Cannabinoidrezeptoren	24
1.7.2 Endogene Cannabinoide	25
1.7.3 Regulation der Nahrungsaufnahme durch Endocannabinoide	26
1.7.4 Der CB1-Rezeptor Antagonist Rimonabant	28
1.7.5 Abbauende Enzyme im Endocannabinoidsystem	29
1.8 Fettsäureamidhydrolase (FAAH)	29
1.8.1 Fettsäureamide	30
1.8.2 Molekularer Aufbau und Struktur von FAAH	30
1.8.3 Einfluss von FAAH auf Endocannabinoidspiegel	32
1.8.3.1 Tiermodelle	32
1.8.3.2 Humane Befunde	32
1.8.4 Assoziationsstudien zu FAAH und Adipositas	33
1.9 Ziel der Arbeit	34

2	Material und Methoden	35
2.1	Geräte und Chemikalien	35
2.1.1	Geräte	35
2.1.2	Chemikalien	36
2.1.3	Puffer	38
2.1.3.1	Puffer für die DNA-Isolierung	38
2.1.3.2	Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese	38
2.1.3.3	Puffer für die Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP)	39
2.1.3.4	Puffer für die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	39
2.1.4	Oligonukleotide und Restriktionsenzyme	40
2.1.4.1	Oligonukleotide	40
2.1.4.2	Restriktionsenzyme	41
2.2	Probandenkollektiv	41
2.3	Gewinnung und Aufarbeitung der DNA-Proben	43
2.3.1	Isolierung genomischer DNA	43
2.3.2	Konzentrationsbestimmung und Verdünnung	44
2.4	In-vitro Amplifizierung von DNA	44
2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
2.4.1.1	Durchführung der PCR	44
2.4.1.2	Spezifitätssteigernde PCR-Programme	45
2.5	Agarose-Gelelektrophorese	46
2.5.1	Herstellung von Agarose-Gelen	47
2.5.2	Durchführung der Gel-Elektrophorese	47
2.6	Methoden des Mutationsscreenings	47
2.6.1	Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP)	47
2.6.1.1	Herstellung eines Polyacrylamidgels	48
2.6.1.2	Durchführung der SSCP	48
2.6.1.3	Silberfärbung	49
2.6.2	Denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	50
2.6.2.1	Durchführung der dHPLC	53
2.6.3	DNA-Sequenzierung	53
2.7	Genotypisierungsverfahren	54
2.7.1	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)	54
2.7.1.1	Durchführung	55

2.7.2 Tetra-primer Arms-PCR (Allel-spezifische PCR)	55
2.8 Statistische Verfahren	57
2.8.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	57
2.8.2 Statistische Tests	58
2.8.2.1 Chi-Quadrat (χ^2) - Test	59
2.8.2.2 Der exakte Test nach Fisher	60
2.8.2.3 Bonferroni Korrektur für multiples Testen	61
2.8.2.4 Transmissions-Ungleichgewichts-Test (TDT)	61
3 Ergebnisse	63
3.1 Strukturelle Untersuchung des Kandidatengens Fettsäureamidhydrolase	63
3.2 Genotypisierung von vier Polymorphismen im FAAH-Gen	63
3.3 Mutationsscreening des FAAH-Gens	65
3.3.1 Bestätigung bereits genotypisierter SNPs	66
3.3.2 Identifizierung von zwei neuen Polymorphismen	68
3.4 Transmissions-Ungleichgewichts-Test (TDT) für IVS1+22G>A	70
3.5 Assoziationsstudie für den FAAH-SNP rs324420	71
3.6 Analysen der Exons 2, 5, 6, 9, 10, 13 und 14	72
3.6.1 Mutationsscreen der Exons 2, 5, 6, 9, 10, 13 und 14	73
3.6.2 Transmissionsdisequilibriumtests für c.822G>A und IVS13-5C>T	73
3.7 Nachfolgende Arbeiten	74
4 Diskussion	76
4.1 Auswahl der Studienkollektive	76
4.2 Methoden zur Mutationsdetektion	77
4.2.1 PCR	77
4.2.2 Methoden zur Detektion unbekannter Sequenzvarianten	79
4.2.2.1 SSCP	79
4.2.2.2 dHPLC	79
4.2.2.3 Sequenzierung	79
4.3 Das Kandidatengen Fettsäureamidhydrolase	80
4.3.1 SNP IVS1+22G>A im ersten Intron	80
4.3.2 SNP rs324420 im dritten Exon	80
4.3.3 SNP rs41309147 im Intron 6 und rs324419 in Exon 7	81
4.3.4 SNP rs2295632 im 3'Bereich	82
4.3.5 Zusammenfassende Beurteilung	82

5	Zusammenfassung	83
6	Literaturverzeichnis	84
7	Anhang	94
7.1	Verzeichnis der Abbildungen	94
7.2	Verzeichnis der Tabellen	95
7.3	Verzeichnis der Abkürzungen	96
8	Danksagung	99

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Adipositas

Die Prävalenz der Adipositas ist seit Beginn der 1980'er Jahre weltweit dramatisch angestiegen (Stunkard *et al.*, 1990). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) spricht sogar von einer epidemieartigen Entwicklung, die keineswegs abzuklingen scheint (Hill *et al.*, 2003). Global gesehen gibt es bereits mehr über- als untergewichtige Menschen (siehe Abb. 1-1). Zurzeit sind weltweit über 1,6 Billionen Erwachsene übergewichtig; für das Jahr 2015 prognostiziert die WHO eine Erhöhung auf 2,3 Billionen (WHO 2006a). In Deutschland beträgt der Anteil der Übergewichtigen an der erwachsenen Bevölkerung etwa 50 %; davon sind etwa 20 % adipös (Statistisches Bundesamt, Leben in Deutschland - Mikrozensus 2005 – Presseexemplar, Juni 2006). Auch die Entwicklung der jüngeren Generationen ist sehr beunruhigend. 14 Millionen übergewichtige und 3 Millionen adipöse Kinder und Jugendliche leben in Europa. In Deutschland sind 1,9 Millionen (15 %) der 3- bis 17-Jährigen übergewichtig und davon 800.000 (6,3 %) adipös (Kurth und Schaffrath Rosario 2007).

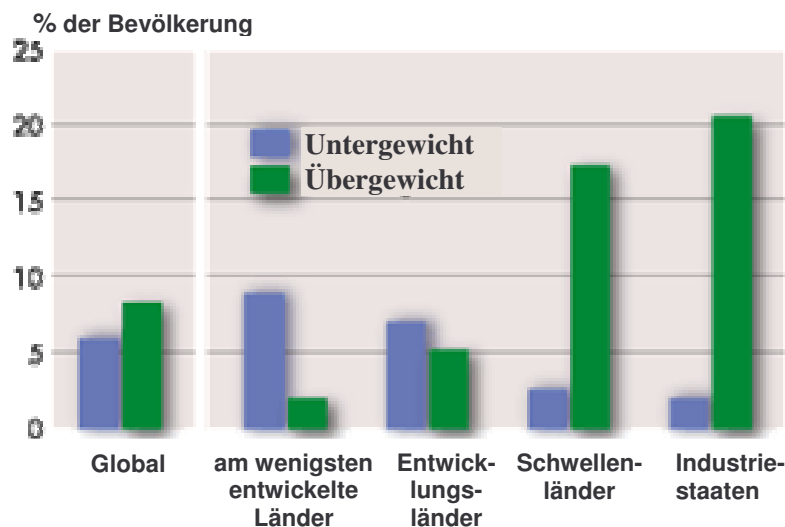


Abb. 1-1: Vergleich des prozentualen Anteils der Über- und Untergewichtigen in Bevölkerungen unterschiedlich stark entwickelter Länder (modifiziert nach WHO 2002).

Die Ursachen für diese Entwicklung sind vielfältig. Sich ändernde Lebensbedingungen mit steigendem Konsum hochkalorischer Nahrung und verminderter körperlicher Aktivität können auf dem Boden genetischer Veranlagungen zu einem Anstieg der Körperfettmasse führen. Die Gefahr dieser Entwicklung ist in der mit Übergewicht assoziierten gesteigerten Morbidität und Mortalität begründet (Classen *et al.*, 1998). Bereits in der Kindheit sind Folgekrankheiten mit Störungen sowohl auf somatischer wie auch psychosozialer Ebene zu beobachten.

1.2 Definition und Diagnose der Adipositas

Adipositas bezeichnet einen Zustand mit pathologisch erhöhtem Körperfettanteil an der Gesamtkörpermasse bezogen auf Alter und Geschlecht. Der hohe Fettanteil ist die Folge unangemessen hoher Energiezufuhr bei vergleichsweise geringem Energieverbrauch. Resultat ist in einer erhöhten Fettspeicherung und eine damit verbundene Gewichtszunahme. Es existieren eine ganze Reihe von Verfahren zur Bestimmung des Körperfettanteils wie Bioelektrische Impedanzmessung, standardisierte Körperumfangsmessung, Sonographie, Computertomographie, Magnetresonanztomographie oder Hautfaltendickemessung (Hebebrand und Remschmidt 1995). Oft sind diese Methoden relativ ungenau bzw. für die routinemäßige Bestimmung zu aufwendig. Das gängigste und auch einfachste Verfahren zur Quantifizierung der Adipositas ist die Bestimmung des Körpermassenindex, des so genannten Body-Mass-Index (BMI). Dabei handelt es sich um eine relative, d.h. körperhöhenbereinigte Größe, die definiert ist als Körpergewicht in Kilogramm dividiert durch das Quadrat der Körperlänge in Metern (nach WHO 2003):

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht (kg)}}{\text{Körperlänge (m}^2\text{)}}$$

Der BMI zeigt eine relativ hohe Korrelation mit dem Körpergewicht ($r = 0,6-0,8$) (Dietz und Robinson 1998) bei einer niedrigen Korrelation zur Körperhöhe ($r = -0,2$ bis $0,35$ je nach Alter) (Watson *et al.*, 1979). Von der WHO (WHO 2006b) wird er zur Definition verschiedener Gewichtsklassen herangezogen.

Tab. 1-1: Klassifikation der Adipositas anhand des Body-Mass-Index nach Empfehlung der Weltgesundheitsorganisation (modifiziert nach WHO 2006b).

<u>Gewichts-Klassen</u>		<u>BMI [kg/m²]</u>
Untergewicht		< 18,5
Normalgewicht		18,5 – 24,99
Präadipositas		25 - 29,99
Adipositas	Grad I	30 – 34,99
Adipositas	Grad II	35 – 39,99
extreme Adipositas	Grad III	≥ 40

Demzufolge ist Adipositas im Erwachsenenalter definiert als ein BMI gleich bzw. größer 30 kg/m^2 . Ab einem BMI von 40 kg/m^2 spricht man von extremer Adipositas. Übergewicht ist definiert als ein BMI größer 25 kg/m^2 . Einschränkungen dieser Messmethode bestehen in einem Mangel an Differenzierung der Körperzusammensetzung und der Fettverteilung. Zum Beispiel kann ein hoher Anteil an Muskelmasse zu einer falschen Klassifizierung in die Gruppe der Adipösen führen. Insgesamt zeigt der BMI bei übergewichtigen und adipösen Erwachsenen eine vergleichsweise gute Korrelation mit dem prozentualen Anteil der Körperfettmasse (Hebebrand *et al.*, 1994).

Kinder und Jugendliche hingegen zeigen entwicklungs- und geschlechtsabhängige Unterschiede der Körperfettanteile und der fettfreien Masse. Zum Beispiel steigt der BMI postpartal rasch an, um ab einem Alter von etwa sechs Monaten bis zum sechsten Lebensjahr, dem so genannten „Adiposity rebound“ (Umkehrpunkt), wieder zu fallen (Rolland-Cachera *et al.*, 1987). Demzufolge ist der BMI zur Einteilung von Gewichtsklassen bei Kindern und Jugendlichen alleine genommen wenig sinnvoll. In dieser Altersgruppe hat sich die Verwendung von geschlechtsspezifischen BMI-Altersperzentilen durchgesetzt, die anhand von populationsspezifischen Referenzwerten erstellt werden (Gray 1989). Diese erlauben es, den individuellen BMI mit dem geschlechtsspezifischen BMI der gleichen Altersgruppe in Beziehung zu setzen. In Deutschland wird Übergewicht im Kindes- und Jugendalter in der Regel als ein BMI $> 90.$ und Adipositas $> 97.$ Perzentile definiert (Kromeyer-Hausschild *et al.*, 2001 und Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes und Jugendalter). International gibt es allerdings keine einheitliche, standardisierte Einigung bezüglich der Gewichtsgrenzen.

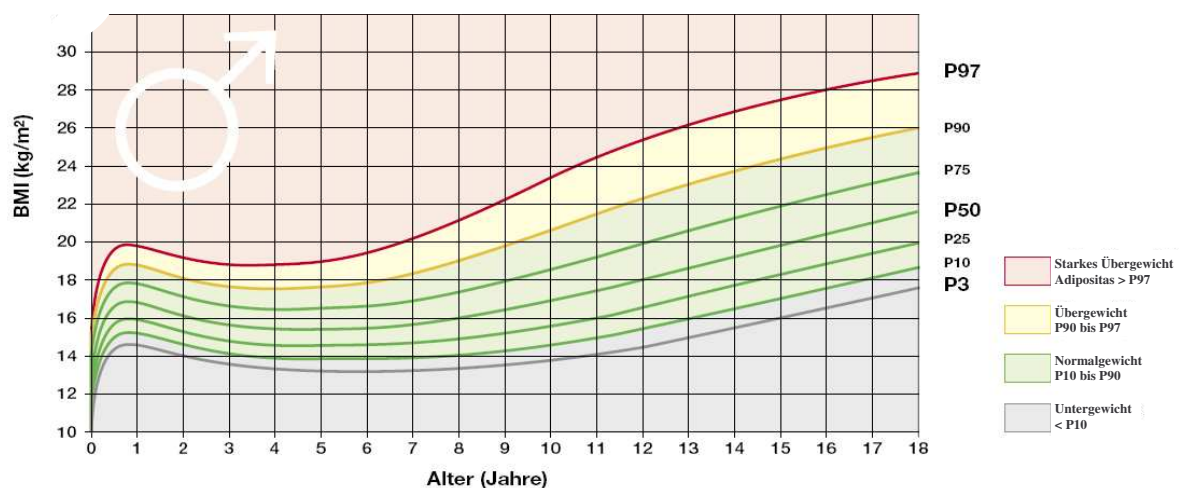


Abb. 1-2: BMI-Perzentilen für Kinder und Jugendliche im Alter von 0 bis 18 Jahren am Beispiel für das männliche Geschlecht (modifiziert nach Kromeyer-Hausschild *et al.*, 2001).

Ein ergänzendes Verfahren, das die lokale Fettgewebsverteilung erfasst, ist die so genannte „waist-to-hip-ratio“ (Taille-Hüft-Relation). Liegt das Verhältnis Taillen- zu Hüftumfang bei Frauen $> 0,85$

und bei Männern $> 1,0$, spricht man von einem androiden (= abdominal-visceralen) Fettverteilungstyp. Dieser weist im Vergleich zum gynoiden (= glutoefemoralen) Fettverteilungstyp ein besonders stark erhöhtes Risiko für adipositasassoziierte Stoffwechselerkrankungen wie das Metabolische Syndrom und kardiovaskuläre Risiken auf (Guagnano *et al.*, 2007).

1.3 Folge- und Begleiterkrankungen der Adipositas

Adipositas stellt einen wichtigen Risikofaktor für eine ganze Reihe von Folgeerkrankungen dar. Im Kindesalter ist das gesundheitliche Risiko ab einem BMI von 25 kg/m^2 erhöht und ab einem BMI von über 40 kg/m^2 deutlich gesteigert (WHO 1998). Vor allem das metabolische Syndrom, bestehend aus arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus Typ II, Dyslipoproteinämie assoziiert mit Adipositas, ist mit 35 % eine der häufigsten und in den letzten Jahren stark zunehmende Begleiterkrankung. Ebenso zeigen sich vermehrt orthopädische Folgestörungen (35 %), Steatosis hepatis (30 %), Cholezystolithiasis (2 %), Depressionen (43 %) und Angststörungen (40 %) (Wabitsch 2004). Auch Störungen des kardiovaskulären, pulmonalen, endokrinen und renalen Systems sowie des Gastrointestinal-Trakts können Konsequenzen überhöhter Körperfettmasse darstellen (Ebbeling *et al.*, 2002). Ebenso ist ein erhöhter BMI ein Risikofaktor für einige Malignome, wie Mamma-, Endometrium- und Kolonkarzinom (WHO 2006a). Nicht zu vernachlässigen sind die psychosozialen Folgen, wie Probleme bei der Partnersuche, verminderte Lebensqualität, eingeschränktes Selbstwertgefühl, verringerte körperliche Leistungsfähigkeit und eine rasche Ermüdbarkeit (Ebbeling *et al.*, 2002). Aufgrund des Fortbestehens der Adipositas bis ins Erwachsenenalter ist in den meisten Fällen mit einer Zunahme sowohl der Intensität bereits bestehender Symptome als auch der Anzahl neu auftretender Begleiterkrankungen zu rechnen (Whitaker *et al.*, 1997).

Das Risiko einer Persistenz beziehungsweise Progredienz der Adipositas ist abhängig von dem Zeitpunkt des „adiposity rebound“, dem Gewichtsstatus der Eltern und dem Alter des Kindes. Hierbei gilt, je eher ein Kind den Umkehrpunkt erlebt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit im Erwachsenenalter adipös zu bleiben (Rolland-Cachera *et al.*, 1987). Der Gewichtsstatus der Eltern, der vor allem bei einem Alter des Kindes unter fünf Jahren entscheidend ist, und das Alter des übergewichtigen Kindes zeigen ebenfalls eine positive Korrelation mit dem Fortbestehen der Adipositas (Whitaker *et al.*, 1997).

1.4 Therapie der Adipositas

Der eigentliche Krankheitswert der Adipositas liegt in der assoziierten Morbidität und Mortalität, die eine Behandlung ersterer begründen. Im Erwachsenenalter ist die Einleitung einer Therapie des

Übergewichts indiziert ab einem BMI $> 30 \text{ kg/m}^3$ und/oder, wenn bereits adipositasassoziierte Begleit- und/oder Folgeerkrankungen vorliegen (Leitlinien der Deutschen Adipositasgesellschaft 2007). Dem gegenüber sieht die Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter (2001) unabhängig von Komorbiditäten einen Interventionsbedarf ab einem BMI $> 90.$ Perzentile. Das Vorhandensein von Begleiterkrankungen beeinflusst gemäß diesen Empfehlungen lediglich die Intensität der therapeutischen Maßnahmen (Barlow und Dietz 1998).

Grundlage jeder Adipositastherapie ist ein multimodales Konzept mit den drei Säulen Ernährungs-, Verhaltens- und Bewegungstherapie. Dabei sollten langfristige therapeutische Maßnahmen mit regelmäßiger Betreuung über Jahre zur Sicherung eines dauerhaften Behandlungserfolgs angestrebt werden. Im Kindes- und Jugendalter ist die Einbeziehung von Personen des engeren sozialen Umfeldes sinnvoll (Barlow und Dietz 1998).

Bei ausbleibendem Therapieerfolg oder bereits gravierenden Begleiterkrankungen kann eine adjuvante medikamentöse Therapie eingeleitet werden. Zurzeit stehen zwei Gruppen von verschreibungspflichtigen Arzneimitteln zur Verfügung: (1) Appetitzügler aus der Gruppe der Antidepressiva (Selektive Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer) wie Sibutramin (O'Meara *et al.*, 2002) oder (2) Lipasehemmer wie Orlistat, die die Fettresorption aus dem Gastrointestinaltrakt hemmen (O'Meara *et al.*, 2001). Der Cannabinoidrezeptor-1-Antagonist Rimonabant wird aufgrund gravierender Nebenwirkungen seit Oktober 2008 nicht mehr für die Therapie der Adipositas empfohlen (EMA 2008). Daneben stehen unter speziellen Bedingungen weitere Therapieoptionen zur Auswahl: beispielsweise Biguanide (Metformin) bei Adipösen mit gleichzeitiger Insulinresistenz und Hyperinsulinämie, Somatostatin-Analoga (Octreotid) bei hypothalamischer Adipositas, Wachstumshormone bei Vorliegen eines Prader-Willi-Syndroms oder Leptin bei kongenitaler Leptindefizienz (Ebbeling *et al.*, 2002).

In besonders schweren, therapieresistenten Fällen verbleibt als letzte Option die Adipositas-Chirurgie. Hier kommen zum einen restriktive Verfahren wie das Gastric banding oder die Gastroplastik zum Einsatz, die einen kleinen proximalen Magenpouch erzeugen, so dass das Sättigungs-/Völlegefühl früher eintritt. Zum anderen besteht die Möglichkeit mit verschiedenen Verfahren durch Verkleinerung des Magens und Verkürzung des Dünndarmabschnitts künstlich eine Malabsorption herbeizuführen (Elder und Wolfe 2007). Des Weiteren sind endoskopische Verfahren wie eine Ballon-Implantation in den Magen oder die neuere Methode des Gastric pacing zu nennen, bei dem eine intragastrale Schrittmacherelektrode ein Sättigungsgefühl induziert (Müller 2003). Insgesamt sind alle diese Methoden mit einem nicht unerheblichen Risiko behaftet, so dass eine sorgfältige Indikationsstellung erfolgen muss.

1.5 Ätiologie der Adipositas

Adipositas ist eine komplexe, systemische Stoffwechselstörung, die durch eine über das Normalmaß hinausgehende Vermehrung des Körperfetts gekennzeichnet ist. Als Ursache dieses erhöhten Anteils der Fettmasse am Gesamtkörpergewicht werden zum einen Umwelteinflüsse und zum anderen genetische Faktoren diskutiert. In einigen seltenen Fällen ist es möglich, eindeutig genetische Einflüsse als Auslöser zu benennen.

1.5.1 Syndromale Formen der Adipositas

Ist Adipositas mit weiteren Symptomen aufgrund einer gemeinsamen genetischen Ätiologie assoziiert, spricht man von einem Syndrom. Die häufigste Form syndromaler Adipositas ist das Prader-Willi-Syndrom. Diese neurogenetische Erkrankung geht in der Neugeborenenphase mit Gedeihstörungen wie muskulärer Hypotonie und Hypophagie einher. Ab dem zweiten Lebensjahr treten zunehmend Hyperphagie mit zentraler Adipositas, mentale Retardierung und Hypogonadismus in den Vordergrund. Ursache ist ein Funktionsverlust der Gene im Abschnitt q11-q13 des paternalen Chromosoms 15, die dem Prinzip des Imprintings unterliegen. Bei 70 % der Patienten liegt eine Mikrodeletion des väterlichen Chromosoms 15q11-q13 vor, bei 28 % der Patienten ist eine uniparentale Disomie die Ursache und in weniger als 2 % liegt ein Imprinting-Fehler vor (Gunay-Aygun *et al.*, 2001). Ein dem Prader-Willi-Syndrom ähnlicher Phänotyp wird durch die unten beschriebene Mutation im Single-minded-homologue-1 (*SIM1*)-Gen bedingt. (Gilhuis *et al.*, 2000).

Weitere mit Adipositas assoziierte Syndrome sind das Bardet-Biedl-, das Cohen-, das Alström- und das Börjeson-Forssman-Lehmann-Syndrom sowie die hereditäre Albright-Osteodystrophie. Auch wenn die Pathophysiologie vieler dieser Syndrome bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt ist, so haben bereits erkannte genetische Grundlagen zum Verständnis sowohl der Ätiologie der Adipositas als auch der Regulation des Körpergewichts beigetragen und können auch in Zukunft zum Verständnis der molekularen Mechanismen beisteuern (Stefan und Nicholls 2004).

1.5.2 Monogene Formen der Adipositas

In der Literatur werden wenige monogene Formen der Adipositas beim Menschen beschrieben, die durch Dysfunktion nur eines Gens bedingt sind. Der Übergang zu syndromalen Formen ist fließend, da der Ausfall eines Genproduktes zu mehreren Symptomen führen kann. Die erstmals 1997 beschriebene kongenitale Leptindefizienz ist ursächlich für eine frühmanifeste schwergradige Adipositas. Grund ist eine homozygote Basenpaardeletion, die zu einer Leserasterverschiebung führt. Das entstehende Hormon ist funktionslos und kann somit nicht an den Leptinrezeptor binden. Da-

durch bleibt die appetithemmende Wirkung im Hypothalamus aus. Tägliche subkutane Leptin-gaben stellen eine Therapiemöglichkeit dar (Montague *et al.*, 1997). Ein Jahr später fand man einen Defekt im humanen Leptinrezeptor, der neben massiver frühkindlicher Adipositas auch zu hypothalamischem Hypogonadismus sowie zu einer Beeinträchtigung der Sekretion von Thyro-tropin und Wachstumshormon führt (Clement *et al.*, 1998). Bei dieser Form kann man im Ge-gensatz zum Leptinmangel durch Behandlung mit rekombinantem Leptin keine Normalisierung des Essverhaltens und keine Gewichtsreduktion bewirken (Farooqi *et al.*, 1999).

Drei Mutationen sind im Proopiomelanocortin-Gen (*POMC*-Gen) beschrieben, die mit früh beginnender Adipositas, roter Haarfarbe und Nebennierenrindeninsuffizienz einhergehen (Krude *et al.*, 1998). POMC ist ein Präprohormon, das posttranslational in die Hormone ACTH (Adrenocortico-tropes Hormon) oder MSH (Melanozyten stimulierendes Hormon) gespalten wird, deren Fehlen die oben beschriebenen Symptome erklärt. Die proteolytische Spaltung von POMC wird durch das En-zym Prohormonkonvertase-1 katalysiert. In diesem wurde bislang eine einzige rezessive Mutation nachgewiesen, die frühkindliche Adipositas bedingt (Jackson *et al.*, 1997). Holder und seine Mitar-beiter entdeckten als fünfte rezessiv vererbte Mutation im Jahre 2000 einen Bruch im SIM-1-Gen (Single-minded-homologue-1), verursacht durch eine Translokation. Der Faktor SIM-1 scheint wichtig für die Ausbildung des Nukleus supraopticus und paraventricularis zu sein. Bei Letzterem handelt es sich um einen für die Regulation des Körpergewichts wichtigen hypothalamischen Kern, der den Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R) exprimiert (Holder *et al.*, 2000).

Als Ursache einer autosomal dominanten monogenen Form der Adipositas beim Menschen wurde eine Mutation im Peroxysomen-Proliferator-aktivierenden Rezeptor Gamma (PPAR γ), einem nu-kleären Rezeptor und Regulator der Adipozytendifferenzierung, beschrieben (Ristow *et al.*, 1998).

Die häufigste zurzeit bekannte monogene Form der Adipositas ist ein Defekt im MC4-Rezeptor (Hinney *et al.*, 2004a). Insgesamt findet man bei ca. 2,5 % der extrem adipösen Kinder und Jugendlichen in Deutschland eine Mutation im MC4R-Gen (Hinney *et al.*, 2003). Mehr als 130 weltweit bekannte funktionsrelevante Mutationen führen zu einer vollständig gestörten oder einge-schränkten Rezeptorfunktion (Fan und Tao 2009). Bereits eine Mutation in einem der beiden MC4R-Allele ist ausreichend, eine Adipositas auszulösen. Bei Vorliegen einer Compound-Hetero-zygotie oder einer Homozygotie der gleichen Mutation kommt es zu einer stärkeren Ausprägung des Phänotyps. Dies entspricht einem dominanten Erbgang. Dagegen haben Träger des seltenen V103I-Allels eine leicht geringere Wahrscheinlichkeit, eine Adipositas zu entwickeln (Geller *et al.*, 2004).

1.5.3 Polygene Formen der Adipositas

Die oben aufgeführten syndromalen und monogenen Formen der Adipositas sind insgesamt sehr selten und erklären lediglich bei einem kleinen Anteil der Adipösen den Phänotyp. Auch das Bestreben, weitere monogene Formen zu identifizieren, scheint sich langsam zu erschöpfen. Für die Mehrzahl der Adipösen gibt es eine andere Erklärung für den gesteigerten Körperfettanteil.

Das Körpergewicht ist ein quantitativer, also in der Merkmalsausprägung kontinuierlich messbarer, und komplexer Phänotyp. Er wird durch ein Zusammenspiel vieler möglicherweise interagierender Umwelteinflüsse und genetischer Faktoren beeinflusst. In Formalgenetischen Studien konnte gezeigt werden, dass 50-80 % der Varianz des BMI erblich bedingt sind. Gemeinsam erlebte Umweltfaktoren wie familiäre Ess- und Trinkgewohnheiten haben im Kindesalter einen geringen Einfluss, mit zunehmendem Alter jedoch praktisch keine Bedeutung mehr. Vielmehr scheinen individuell gemachte Umwelterfahrungen die restliche Varianz des BMIs zu erklären (Hinney *et al.*, 2004b).

Obwohl alle bisher durchgeführten formalgenetischen Studien auf eine Beteiligung genetischer Faktoren an der Ausprägung des Körpergewichtes hinweisen, zeigen die Studien deutliche Differenzen in der Größe der Heritabilitätsschätzungen. In Zwillingsstudien wird diese beständig am höchsten eingeordnet. Zum Beispiel konnten Stunkard und seine Mitarbeiter zeigen, dass die Intraparkorrelationen des BMI bei gemeinsam und getrennt aufgewachsenen monozygoten Zwillingen ungefähr identisch sind. Die Heritabilitätsschätzungen für den BMI beliefen sich auf etwa 70 % (Stunkard *et al.*, 1990). In Adoptionsstudien konnte kein oder nur ein geringer Zusammenhang zwischen dem BMI der Adoptiveltern und der Adoptivkinder gefunden werden. Folglich scheinen auch hier genetische Faktoren einen großen Einfluss auf das Körpergewicht zu haben (Hinney *et al.*, 2004b). Die Korrelation zwischen elterlichem BMI und dem der Kinder liegt in allgemeinen Familienstudien bei 0,1 bis 0,3 (Bouchard und Perusse 1993). Einzelne neuere und groß angelegte Familienuntersuchungen gehen allerdings von einer Heritabilität von bis zu 0,7 aus (Maes *et al.*, 1997). Wiederholt konnten höhere Mutter- als Vater-Kind-Korrelationen nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür wird in einer intrauterinen Prägung oder in einem stärkeren Einfluss der Mutter auf die kindlichen Lebensbereiche gesehen (Hinney *et al.*, 2004b).

Diese doch sehr diskrepanten Ergebnisse formalgenetischer Studien können zum Teil durch so genannte epistatische genetische Effekte erklärt werden (Stunkard *et al.*, 1990). Darunter versteht man additive und nicht-additive Alleleffekte wie verschiedenste Gen-Gen-Interaktionen. Letztere erklären vor allem die unterschiedlichen Heritabilitätsschätzungen in Familien- und Zwillingsstudien. Die Wahrscheinlichkeit, dass die gleichen Gen-Gen-Interaktionen wirksam werden, ist bei

monozygoten Zwillingen im Vergleich zu erstgradigen Verwandten deutlich höher (Maes *et al.*, 1997).

Heute geht man anhand vieler Studien davon aus, dass ohne genetische Prädisposition Übergewicht nicht entstehen kann. Diese erblich bedingte Anfälligkeit Adipositas zu entwickeln resultiert aus dem Zusammenspiel aller Allele eines Individuums, die Einfluss auf Energiezufuhr, -aufnahme und -verbrauch haben. Dabei besitzen die einzelnen Genvarianten einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Ausprägung des polygen vererbten Merkmals Adipositas. So genannte Hauptgene haben eine starke Auswirkung auf das Gewicht, während andere Allele, als Polygene bezeichnet, nur einen kleinen, entsprechend schwer nachzuweisenden Effekt beisteuern (Hebebrand *et al.*, 2001). Doch durch die Wirkung vieler solcher kleinen Effekte kann, analog zu einem Hauptgeneffekt, ein erheblicher Einfluss auf Stoffwechsel und Verhalten resultieren. Wann und in welchem Ausmaß es dann letztlich zur Ausbildung eines adipösen Phänotyps kommt, hängt von der Art und Anzahl der prädisponierenden Allele und dem Einfluss verschiedener Umweltfaktoren ab (Hinney *et al.*, 2004b).

Ein Beispiel für ein Polygen, ist das erst kürzlich in das Interesse der Adipositasforschung gerückte FTO-Gen (fat mass and obesity associated). Nachdem in zwei genomweiten Assoziationsstudien zunächst eine Assoziation zu Diabetes mellitus Typ II entdeckt wurde, zeigt eine Korrektur für den BMI eine Assoziation mit Adipositas. Homozygote Träger des Risiko-Allels (A-Allel des SNPs rs9939609) sind im Durchschnitt drei Kilogramm schwerer und haben ein 1,67 -fach erhöhtes Risiko Adipositas zu entwickeln als Erwachsene ohne Risiko-Allel (Frayling *et al.*, 2007). Wie viele Genvarianten mit ähnlich hohem oder kleinerem Einfluss auf das Körpergewicht existieren und in wie weit Gen-Gen und Gen-Umwelt-Interaktionen eine Rolle für die Entwicklung des BMI spielen ist bisher unbekannt. Dies zeigt, dass weitere Forschung nötig ist, um die Ätiologie der Adipositas besser verstehen zu können.

Alle bisher aufgeführten Theorien zur Adipositasätiologie erklären nicht die in den letzten Jahren zunehmende Prävalenz des Übergewichts. Diese Zunahme und die von der WHO prognostizierte weitere, epidemieartige Ausbreitung verdeutlichen die Bedeutung von Umweltfaktoren bei der Entstehung von Adipositas. So wird der modernen Lebensweise mit Zunahme der körperlichen Inaktivität, veränderter Nahrungszusammensetzung, zunehmend größeren Mahlzeitenportionen und einem Überangebot an energiedichten Nahrungsmitteln ein entscheidender Anteil an dieser Entwicklung zugeschrieben (Ebbeling *et al.*, 2002; Hebebrand *et al.*, 2000). Auffallend ist, dass auf die sich ändernden Umweltbedingungen nicht die gesamte Bevölkerung mit einem Anstieg des Körpergewichts reagiert, wie Untersuchungen aus den USA zeigen (Troiano und Flegal 1998). Das Niveau der Perzentilen hat sich im Bereich von Unter- und Normalgewicht kaum geändert, während ein

starker Anstieg der 90. und 97. Perzentile zu verzeichnen ist (siehe Abb. 1-3) (Kurth und Schaffrath Rosario 2007). Ursache hierfür könnten individuelle genetische Veranlagungen sein, auf deren Grundlage die geänderten Lebensbedingungen zu einem Anstieg des Körpergewichts führen. In Zeiten knapper Nahrungsvorräte, so die „Thrifty Genotype“ (= sparsamer Genotyp) Hypothese, kommt es zu einer Ausbreitung von Allelen, die eine vermehrte Nahrungsaufnahme und eine verbesserte Energiespeicherung bedingen (Neel *et al.*, 1998). Die weite Verbreitung dieser einst vorteilhaften Genvarianten wirkt sich unter den geänderten Gegebenheiten nachteilig aus und führt bei einem großen Anteil der Bevölkerung zur Entwicklung von Übergewicht (Hebebrand *et al.*, 2000).

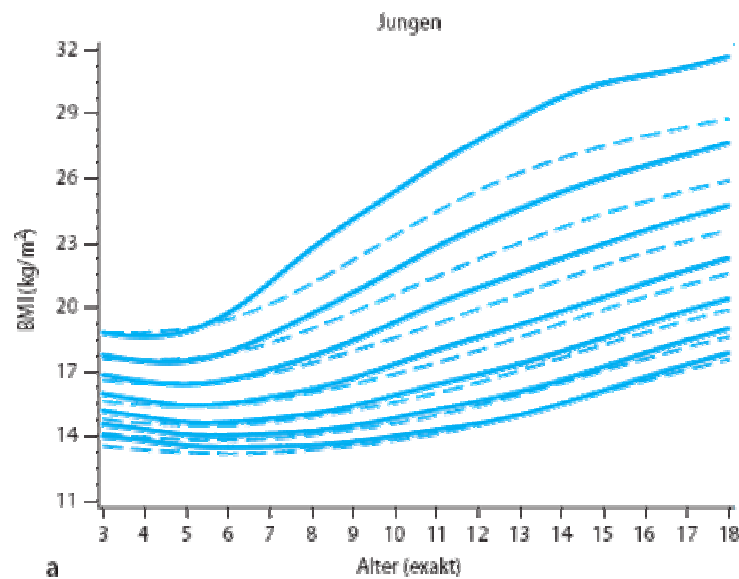


Abb. 1-3: BMI-Perzentilen für Jungen: Vergleich der Daten erhoben 2003 bis 2006 (durchgezogene Linie) mit Referenzdaten aus den Jahren 1985 bis 1999 (gestrichelte Linie) von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (Kurth und Schaffrath Rosario 2007).

Ein weiterer Erklärungsansatz für die gesteigerten Prävalenzraten insbesondere der extrem Übergewichtigen wird in der zunehmenden psychosozialen Stigmatisierung Adipöser gesehen. Dies könnte zu einer selektiven Partnerwahl und auf der Grundlage einer polygenen Vererbung zu einer quantitativ höheren Belastung der Nachkommen mit prädisponierenden Allelen führen. Darin könnte der von Generation zu Generation stärkere Ausprägungsgrad der Adipositas begründet sein (Hebebrand *et al.*, 2000).

1.5.4 Sekundäre Formen der Adipositas

Neben den häufigeren primären Ursachen kann Adipositas auch sekundär, als Folge einer anderen Grunderkrankung entstehen. Zu diesen sekundären Formen zählen vor allem endokrinologische Erkrankungen wie Hypothyreose, Cushing-Syndrom, Insulinom, polyzystische Ovarien (Stein-

Leventhal-Syndrom) oder Testosteronmangel bei Männern. In seltenen Fällen kann Adipositas zentral bedingt sein, zum Beispiel durch Hirntumore, Operationen und Bestrahlung. Zuletzt sei noch die medikamentös bedingte Adipositas durch Substanzen unter anderem aus den Gruppen der Neuroleptika und Antidepressiva erwähnt.

1.6 Grundlagen der Gewichtsregulation

Das Körpergewicht des Menschen unterliegt einem komplex regulierten System, das mittels peripherer Hormone, Neurotransmitter und neuronaler Strukturen eine Kommunikation zwischen Fettgewebe, Gastrointestinaltrakt und ZNS ermöglicht. Dadurch unterliegt ihm die Steuerung von Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch in Form von Stoffwechsel, Thermogenese und Aktivität. Dies garantiert eine Balance zwischen Energieaufnahme und –abgabe und über einen längeren Zeitraum die Einstellung eines weitgehend stabilen Körpergewichts. Dieses Gleichgewicht wird als Energiehomöostase bezeichnet, die das Körpergewicht auf einem genetisch individuell determinierten „Setpoint“ hält. Dabei gleichen Kompensationsmechanismen Änderungen der Nahrungsaufnahme und des Energieverbrauchs aus (Schwartz *et al.*, 2000).

1.6.1 Zentrale Regelkreise

Im ZNS interagieren eine Reihe verschiedener Signalstoffe miteinander, die an der Gewichtsregulation beteiligt sind. Dabei besitzen hypothalamische Kerngebiete wie der Nukleus paraventricularis (PVN), der Nukleus arkuatus (ARC), der Nukleus ventromedialis (VMH), der Nukleus dorso-medialis (DMN) und der laterale Hypothalamus (LHA) eine entscheidende Bedeutung als regulatorische Zentren. Aber auch kortikale und subkortikale Hirnareale sowie Kerne des Hirnstamms sind in die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase involviert. Die komplexen Interaktionen zwischen den unterschiedlichen Gehirnbereichen und mit peripheren Organen sind bis heute nicht vollständig verstanden. Einige neuronale und hormonelle Signalwege sind jedoch beschrieben, die Sättigungsgefühl und Nahrungsaufnahme beeinflussen. Diese führen im Hypothalamus zur Freisetzung von Peptiden, die verschiedenen Subpopulationen von Neuronen zugeordnet werden. Diese sind wiederum in einzelnen, oben genannten Kerngebieten des Hypothalamus lokalisiert und projizieren in entsprechende Zielregionen des ZNS. Die Neuropeptide unterteilt man in anorexigene Peptide, die die Nahrungsaufnahme hemmen, und orexigene Peptide, die sie stimulieren (Schwartz *et al.*, 2000).

1.6.1.1 Anorexigene Neurotransmitter

Die zentrale Bedeutung des hypothalamischen Melanocortinsystems für die Gewichtsregulation konnte anhand transgener Tiermodelle und humangenetischer Studien belegt werden (Ellacott und

Cone 2004). Die Peptide dieses Signalweges werden als Melanocortine bezeichnet und entfalten ihre Effekte durch Bindung an Rezeptoren der Melanocortin-Familie: MC1R - MC5R. Sie entstehen durch gewebespezifisches posttranslationales Prozessing des 32 kDa großen Pro-Peptids Pro-opiomelanocortin (POMC) (Schwartz *et al.*, 2000; Wynne *et al.*, 2005). Dieses wird zum einen im Nukleus tractus solitarii (NTS), der überwiegend kurzfristig Hunger und Sättigung beeinflusst (s. u.), und zum anderen im ARC, der durch Leptin eher mit einer langfristigen Gewichtsregulation assoziiert ist, exprimiert. Leptin bindet im ARC an zur Cytokin-Rezeptor-Familie gehörende Leptinrezeptoren und bewirkt an den POMC Neuronen durch Depolarisation eine Erhöhung der Nervenfasersentladungen (Ellacott und Cone 2004).

Das für die Gewichtsregulation wichtigste Spaltungsprodukt aus POMC ist der α -Subtyp des melanozytenstimulierenden Hormons α -MSH. Den Namen erhielt das Hormon durch seine über den Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R) vermittelte Aktivierung von Melanozyten der Epidermis, die für die Ausbildung der Fell- bzw. Hautfarbe verantwortlich sind (Cone *et al.*, 1996). Für die funktionelle Rolle von α -MSH bei der Regulation des Körpergewichts im ZNS sind maßgeblich die Rezeptoren MC3R und MC4R verantwortlich. Man findet sie in mehreren hypothalamischen Kernen wie dem ARC, dem VMH und dem PVN. Vermittelt über diese Rezeptoren bewirkt α -MSH eine Reduktion der Nahrungsaufnahme, einen gesteigerten Energieverbrauch und eine Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (Wynne *et al.*, 2005). Zusammen mit α -MSH wird in den Neuronen des ARC das so genannte Cocain- und Amphetamin-regulierte Transkript (CART) koexprimiert. Es führt zu einer starken Hemmung der Nahrungsaufnahme (Wynne *et al.*, 2005). Der Rezeptor, über den CART seine Wirkung entfaltet, ist bislang unbekannt.

Die Fasern der POMC/CART Neurone projizieren vom ARC zum PVN, zum LHA und zur perifornicalen Region (PFA) (Wynne *et al.*, 2005). Die dort gebildeten Neuropeptide reduzieren die Nahrungsaufnahme und somit das Körpergewicht. Zu ihnen zählt das Corticotrope-Freisetzungshormon (CRH), das neben seiner Bedeutung als Regulator der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems bedingt. Des weiteren erfolgt die Freisetzung des Thyreotropen-Freisetzungshormons (TRH), das die Nahrungsaufnahme reduziert und die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse stimuliert sowie von Oxitocin, einer anorexigenen Substanz, die ferner uterine Funktionen reguliert (Schwartz *et al.*, 2000).

1.6.1.2 Orexigene Neurotransmitter

Eines der im ZNS am weitesten verbreiteten Peptide ist das 36 AS lange und zur PP (Pankreatic polypeptide) Familie gehörende Neuropeptid Y (NPY). Es bindet an sechs verschiedene Subtypen von NPY-Rezeptoren (Y1 – Y6), von denen vor allem Y1 und Y2 im Hypothalamus weit verbreitet

sind. Über diese kann NPY die Nahrungsaufnahme stimulieren und die metabolische Rate senken. Die Folge sind eingeschränkte Thermogenese im braunen Fettgewebe, verminderte sympathische Aktivität sowie Suppression der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse (Wynne *et al.*, 2005). Für die Regulation der Nahrungsaufnahme sind hauptsächlich die NPY-bildenden Neurone im ARC verantwortlich. Dort ist NPY in Neuronengruppen mit dem Agouti-related Protein (AgRP) kolokalisiert. Häufig wird NPY als am stärksten orexigen (die Nahrungsaufnahme stimulierend) wirkendes Molekül beschrieben. Es hat jedoch, verglichen mit AgRP, nur eine sehr kurze Wirkdauer. Gemessen an der Steigerung der Energieaufnahme durch nur eine einzige Gabe ist AgRP die höhere orexigene Potenz zuzuschreiben (Schwartz *et al.*, 2000; Wynne *et al.*, 2005). Dieses aus 132 Aminosäuren aufgebaute Protein wird überwiegend in Neuronen des ARC gebildet und greift als inverser Agonist am MC3R und MC4R an. Dort inhibiert es die anorexigene Wirkung von α -MSH und führt zu Hyperphagie (Schwartz *et al.*, 2000; Wynne *et al.*, 2005).

Die NPY/AgRP Neurone können Synapsen mit den POMC Neuronen ausbilden. Führt Leptin zu einer Hyperpolarisation der NPY/AgRP Neurone, kommt es zu einer Reduktion der Freisetzung von γ -Aminobuttersäure (GABA), was wiederum eine Disinhibition der POMC-Neurone bedingt (Ellacott und Cone 2004). Außerdem projizieren NPY/AgRP Neurone zum ipsilateralen PVN, LHA und PFA. Dort erfolgt die Freisetzung orexigener Neuropeptide wie dem Melanin-konzentrierenden Hormon (MCH) und Orexin A und B, die durch Aktivierung anaboler Signalwege die Nahrungsaufnahme steigern und den Energieverbrauch senken (Schwartz *et al.*, 2000).

Orexin A und B, auch Hypocretin 1 und 2 genannt, sind Peptidprodukte des Precursorproteins Pre-pro-Orexin. Von ihren Neuronen verlaufen Axone zu vielen Regionen im Gehirn, unter anderem zum ARC, zum NTS und zum Nukleus dorsalis nervi vagi. Die zentrale Wirkung der Orexine ist die Stimulation der Nahrungsaufnahme. Dabei ist die Stimulation bei Orexin A kontinuierlich, bei Orexin B nicht durchgängig nachzuweisen. Doch selbst chronische Gaben führen nicht zu einem Anstieg des Körpergewichts (Wynne *et al.*, 2005). Auch im Magen werden sie, vor allem nach Fastenperioden exprimiert (Konturek *et al.*, 2004). Über den Nervus vagus vermittelt Orexin A eine Steigerung der Magensäureproduktion. Außerdem wird den Orexinen ein Einfluss auf Weckreaktion und Aufmerksamkeit zu geschrieben, womit sie eine Rolle im Schlaf-Wach-Rhythmus spielen. Insgesamt scheinen Orexine unter Hungerbedingungen die Nahrungssuche zu ermöglichen (Schwartz *et al.*, 2000; Wynne *et al.*, 2005).

1.6.2 Periphere Regulation der Nahrungsaufnahme

Die Regulation der Nahrungsaufnahme durch das beschriebene, komplexe hypothalamische Netzwerk integriert metabolische Informationen aus der Peripherie. Insbesondere Signale und Mediator-

ren aus dem Fettgewebe und dem oberen Gastrointestinaltrakt kontrollieren im Hypothalamus die Freisetzung orexigener und anorexigener Neurotransmitter. Unterschieden werden Informationen aus den Energiespeichern, die langfristige Signale weiterleiten, sowie kurzfristige Regulationsmechanismen, die vor und während der Nahrungsaufnahme dem ZNS Rückmeldung über die Energieaufnahme geben.

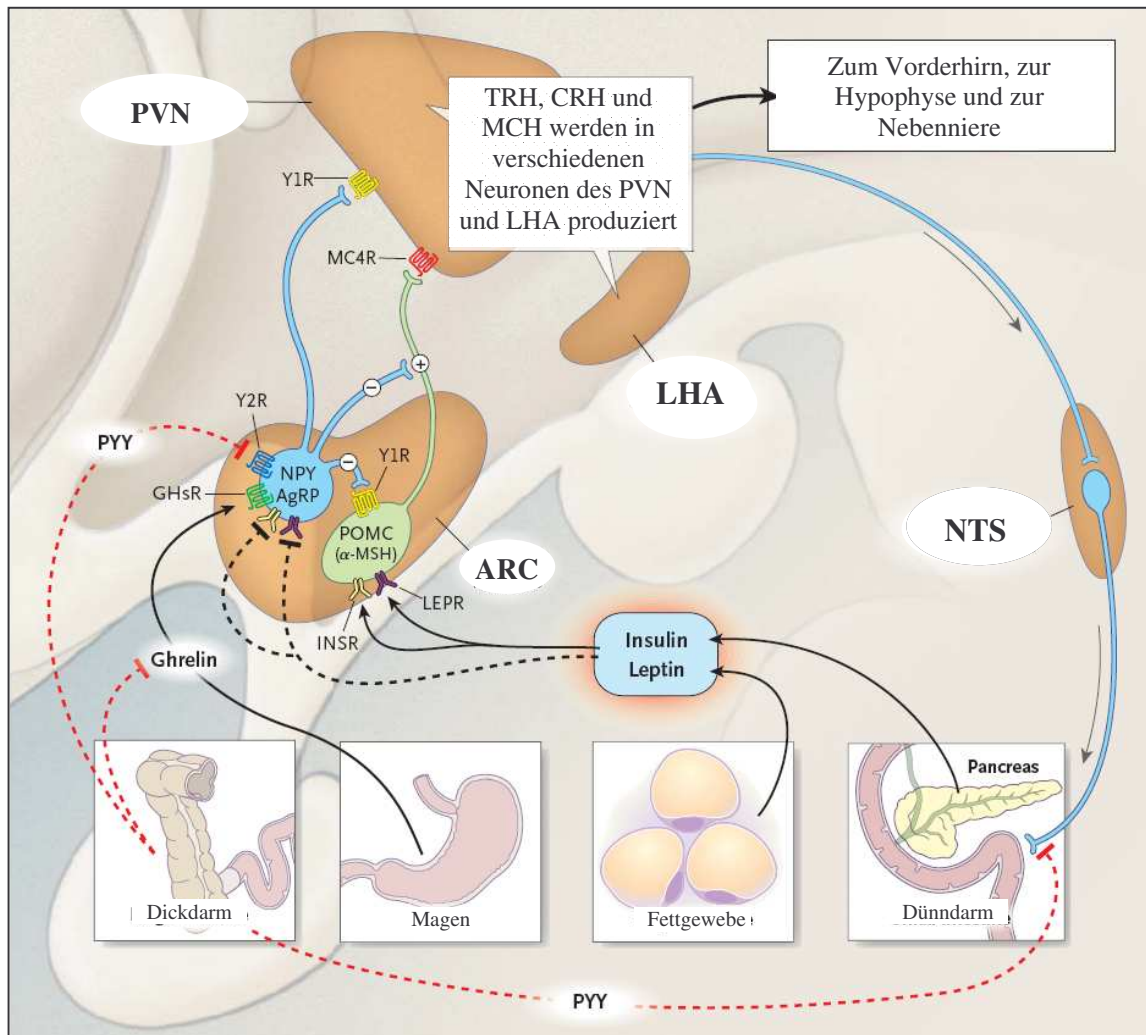


Abb. 1-4: Interaktion hemmender (gestrichelte Linien) und stimulierender (durchgezogene Linien) hormoneller und neuronaler Signalwege, die Nahrungsaufnahme und Körpergewicht regulieren. Y1R und Y2R = Y1 und Y2 Subtypen des Neuropeptid-Y-Rezeptors, MC4R = Melanocortin-4-Rezeptor, PYY = Peptid YY, GHsR = Ghrelin-Rezeptor, AgRP = Agouti related Protein, POMC = Proopiomelanocortin, α -MSH = α -Melanozytenstimulierendes Hormon, LEPR = Leptin-Rezeptor, INSR = Insulin-Rezeptor (modifiziert nach Korner und Leibel 2003).

1.6.2.1 Langfristige Aufrechterhaltung der Energiehomöostase

Das anorektisch wirkende Hormon Leptin hat eine Schlüsselfunktion in der Kontrolle der Gewichtsregulation durch neuronale hypothalamische Kreisläufe inne. Sein Plasmaspiegel steigt mit

zunehmender Körperfettmasse und nimmt ab, wenn die Fettbestände sinken. Adipozyten des weißen Fettgewebes synthetisieren und sezernieren das Hormon, das den Appetit und damit die Nahrungsaufnahme hemmt, aber auch den Energieverbrauch beeinflusst (Wynne *et al.*, 2005). Der Leptinrezeptor gehört zur Familie der Cytokin-Rezeptoren und übt über die Aktivierung der Janus-Kinase/STAT-3 (signal transduction and activators of transcription 3)-Signalwege und die Induktion von Genen die leptinergen Effekte aus (Schwartz *et al.*, 2000). Die Kommunikation mit dem Gehirn erfolgt hauptsächlich über den medialen Hypothalamus. Sowohl die POMC/CART Neurone als auch die NPY/AGRP Neurone exprimieren den Leptin-Rezeptor. Leptin inhibiert die NPY/AGRP Neurone, die wiederum bei niedrigen Leptin-Spiegeln angeregt werden. Entgegengesetzt dazu aktiviert Leptin die POMC/CART Neuronen, die bei niedrigen Leptin-Spiegeln gehemmt werden (Schwartz *et al.*, 2000; Wynne *et al.*, 2005). Von den arkuaten Kerngebieten im Hypothalamus gehen die Signale dann über die oben beschriebenen Neuropeptidsignale weiter zu hypothalamischen und extrahypothalamischen Strukturen.

Für das in den β -Zellen des Pankreas synthetisierte Hormon Insulin wurde als erstes Adipositassignal ein Zusammenhang mit der Regulierung des Körpergewichts durch das ZNS abgeleitet (Schwartz *et al.*, 2000; Wynne *et al.*, 2005). Ebenso wie bei Leptin steigt sein Plasmaspiegel proportional zum Körperfettanteil. Es wird abhängig vom Blutzuckerspiegel ausgeschüttet und gelangt über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS. Dort weisen Insulin-Rezeptoren eine weite Verbreitung unter anderem im Hypothalamus auf mit einer hohen Dichte im ARC. Die regulatorischen Effekte des Insulins werden zum einen durch inhibitorische Wirkung auf NPY Neurone zum anderen über das melanocortinerge System ausgeübt. An POMC Neuronen des ARC führt Insulin über eine Aktivierung zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme.

1.6.2.2 Kurzzeitige Regulation von Hunger und Sättigung

Vor und während der Nahrungsaufnahme werden im Gastrointestinaltrakt Faktoren gebildet, die Hunger und Sättigung von Mahlzeit zu Mahlzeit beeinflussen. Ihre Wirkung erfolgt entweder peripher oder durch Weiterleitung an das ZNS, wodurch sie kurzfristig die Nahrungsaufnahme modifizieren. Zu diesen Signalen zählen von intestinalen, endokrinen Zellen sezernierte anorexigene Sättigungsfaktoren wie Cholezystokinin (CCK), Peptid YY (PYY) oder Oxyntomodulin (OXM), die im Verlauf einer Mahlzeit freigesetzt werden. Demgegenüber kommt es in Fastenzeiten vor allem durch säurebildende Zellen zur Expression und Freisetzung orexigener Faktoren. Hierzu gehören beispielsweise Ghrelin oder Orexin A und B, die eine stimulierende Wirkung auf die Nahrungsaufnahme haben (Konturek *et al.*, 2004). Die orexigenen und anorexigenen Informationen gelangen über den Nervus vagus zum Nukleus tractus solitarii im Hirnstamm, in dem sie mit efferenten hypothalamischen Signalen verschaltet werden, oder stimulieren direkt Neurone im ARC (Korner

und Leibel 2003; Schwartz *et al.*, 2000). Einige der gastrointestinalen Faktoren sollen im Einzelnen besprochen werden.

Während einer Mahlzeit kommt es infolge der Magendehnung zu einer Stimulierung von Vagusfasern. Dies führt im LHA zur Freisetzung des anorexigenen Peptids CCK, das die weitere Nahrungsaufnahme hemmt (Korner und Aronne 2003). Eine Vervielfältigung dieses Effekts wird durch die gleichzeitige Anwesenheit von Leptin erreicht (Schwartz *et al.*, 2000). Gleichzeitig führt die Anwesenheit unverdaulicher Nahrung zu einer peripheren Ausschüttung von CCK im Duodenum und Jejunum. Dies steigert die Absorption von Nährstoffen durch Verlangsamung der Magenentleerung, durch Freisetzung enzymreichen Pankreassekrets und durch Stimulierung der Gallenblasenkontraktion (Korner und Aronne 2003).

In Proportion zu den aufgenommenen Kalorien wird von endokrinen L-Zellen des distalen Dünndarms und des Kolons postprandial das Peptid YY (PYY) sezerniert. Über Inhibition der Magenmotilität und durch afferente vagale Signale reduziert PYY den Appetit und damit die Nahrungsaufnahme. Im Hypothalamus inhibiert das Peptid NPY- und AgRP-exprimierende Neurone im ARC durch Hemmung des Neuropeptid-Y₂-Rezeptors (Korner und Aronne 2003). Außerdem senkt PYY die Konzentration des orexigenen Peptids Ghrelin (Konturek *et al.*, 2004).

Das Proteohormon Ghrelin ist seit langem bekannt als Induktor der Wachstumshormonfreisetzung aus der Hypophyse. Erst später entdeckte man seine Funktion als orexigenes Peptid (Korner und Aronne 2003). Ghrelinspiegel steigen bei leerem Magen präprandial an und sinken ca. eine Stunde nach der Mahlzeit, so dass das Hormon Einfluss auf Hunger und Beginn der Nahrungsaufnahme ausübt (Konturek *et al.*, 2004). Durch die Stimulierung von Ghrelin-Rezeptoren auf hypothalamischen NPY und AgRP Neuronen steigert Ghrelin die Nahrungsaufnahme (Korner und Aronne 2003). Des Weiteren stimuliert es die Gastrinfreisetzung und die Salzsäureproduktion, hemmt die Pankreassekretion und kontrolliert die Magenmotilität. Außerdem vermindert Ghrelin die Freisetzung von Leptin. Leptin kann wiederum den Plasmaspiegel von Ghrelin senken.

Erst kürzlich sind die so genannten Endocannabinoide in das Interesse der Adipositasforschung gerückt. Sie haben ebenfalls eine kurzfristige, orexigene Wirkung und sind Teil des Endocannabinoidsystems. Auf verschiedenen Signalwegen kontrollieren sie sowohl die periphere Lipogenese als auch zentrale Regelkreise der Nahrungsaufnahme (Lichtman und Cravatt 2005). Da sie Thema dieser Arbeit sind, soll auf das Endocannabinoidsystem im Folgenden genauer eingegangen werden.

1.7 Das endogene Cannabinoidsystem

Schon seit Jahrhunderten ist bekannt, dass der Konsum von Cannabis Hunger stimulieren und Appetit, vor allem auf süße und schmackhafte Nahrung, anregen kann. Dieses Phänomen wurde aber erst in den letzten Jahrzehnten wissenschaftlich genauer untersucht (Horvath 2003). In der ersten systematischen Studie im Jahre 1976 konnten Greenberg *et al.* zeigen, dass der chronische Konsum von Marihuana zu einem Anstieg des Körpergewichts und der Nahrungsaufnahme führt. Nach Absetzen der Droge erfolgt ein signifikanter Abfall von Gewicht und Energieaufnahme. Vergleichbare modulierende Effekte auf die Nahrungsaufnahme konnten für Marihuana in weiteren Studien belegt werden (Cota *et al.*, 2003a). Dies führte dazu, dass dieser Pflanze größere Aufmerksamkeit in der Forschung zuteil wurde. Bislang sind fast 500 Inhaltsstoffe im Cannabisharz (Haschisch) identifiziert, darunter 66 Cannabinoide. Die Komponente mit dem stärksten psychoaktiven Effekt im Marihuana ist Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC). Es ist in den USA als Dronabinol zur antiemetischen Behandlung bei Chemotherapie und zur Appetitsteigerung beim HIV-Wasting-Syndrom zugelassen (Schneider *et al.*, 2005).

Einen großen Fortschritt brachte Anfang der 1990er Jahre die Entdeckung spezifischer Rezeptoren und ihrer endogenen Liganden, den so genannten Endocannabinoiden (Horvath 2003). Die zuvor beobachteten Effekte durch die Cannabinoide des Cannabisharzes konnten so physiologisch erklärt werden. Die Aufklärung weiterer molekularer Mechanismen der Cannabinoidaktivierung bestätigte das Vorhandensein eines in vielen Tierarten hoch konservierten Endocannabinoidsystems (Cota *et al.*, 2003a). Es moduliert eine ganze Reihe physiologischer Funktionen, unter anderem Motorik, Gedächtnisfunktionen, Schmerzwahrnehmung und das Essverhalten (Schneider *et al.*, 2005).

1.7.1 Cannabinoidrezeptoren

Bislang sind zwei Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen bekannt: CB1 und CB2, sowie eine Splice-Variante von CB1. Es wird vermutet, dass noch weitere Subtypen existieren. Die Cannabinoidrezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die Bindung eines Agonisten führt zu einer Hemmung der Adenylatzyklaseaktivität sowie einer Modifizierung von Kalium- und Kalziumkanälen. Dadurch beeinflussen sie die Aktivität der Proteinkinase und verändern die Genexpression bestimmter Proteine. Cannabinoidrezeptoren werden präsynaptisch exprimiert und modulieren die Freisetzung anderer Neurotransmitter wie GABA, Dopamin, Noradrenalin, Glutamat und Serotonin (Cota *et al.*, 2003a).

CB1 zeigt eine weite Verbreitung im ZNS mit einer besonders hohen Expression im Zerebellum (wichtig für die Koordination von Bewegung, Balance und Haltung), im Hippokampus (u. a. wich-

tiges Zentrum für Gedächtnisprozesse) und in den Basalganglien (Kontrolle der Bewegung). Ferner ist er im Hypothalamus (Zentrum zur Regulierung der Nahrungsaufnahme) lokalisiert. Daneben befindet er sich in peripheren Organen, wie z.B. endokrine Drüsen, Leber, Fettgewebe, Herz und Fortpflanzungsorganen sowie im Gastrointestinaltrakt (Schneider *et al.*, 2005).

Dagegen wird der CB2-Rezeptor vorwiegend auf Immunzellen exprimiert und ist an der Modulation verschiedener Immunreaktionen beteiligt. Agonisten an diesem Rezeptor wirken immunsuppressiv, antiproliferativ und zytotoxisch. Sie können die Bildung des proinflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) blockieren und so neuronale Zellschäden, z.B. nach Schädelhirntrauma, minimieren (Schneider *et al.*, 2005).

1.7.2 Endogene Cannabinoide

An die oben beschriebenen Rezeptoren binden nicht nur exogene, sondern auch endogene, körpereigene Stoffe. Diese werden in Anlehnung an die im Cannabis harz gefundenen Wirkstoffe Endocannabinoide genannt. Dabei handelt es sich um ungesättigte Fettsäuren, die dem Phospholipidstoffwechsel von Plasmamembranen oder dem Triglyceridstoffwechsel entstammen. Sie können als Neuromodulatoren oder Neurotransmitter wirken und existieren in pmol/l-Konzentrationen im ZNS. Dort werden sie in Neuronen postsynaptisch synthetisiert und unterliegen einer depolarisationsinduzierten, dem Kalzium-Einstrom folgenden Freisetzung (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2005). Anders als klassische Neurotransmitter werden sie nicht in Vesikeln gespeichert, sondern erst bei erfolgtem Reiz gebildet (Horvath 2003). Beispielfhaft sollen im Folgenden zwei unterschiedliche Endocannabinoide beschrieben werden.

Das erste identifizierte Endocannabinoid, das man 1992 entdeckte, war N-Arachidonylethanolamid, besser bekannt als Anandamid. Hierbei handelt es sich um ein Fettsäureamid, das vergleichbare Effekte wie Δ^9 -THC zeigt. Es bindet sowohl an CB1 als auch an CB2, mit höherer Affinität für CB1. Ähnlich Δ^9 -THC stimuliert Anandamid die Nahrungsaufnahme. (Cota *et al.*, 2003a). Doch aufgrund seines schnellen Katabolismus ist seine Wirkung etwas schwächer und von geringerer Dauer (McKinney und Cravatt 2005). N-Arachidonylethanolamid ist, ebenso wie das Endocannabinoid 2-Arachidonylglycerol (2-AG), ein Abkömmling der Arachidonsäure (Rodriguez de Fonseca *et al.*, 2005). Ein Unterschied liegt in der Rezeptorprävalenz. 2-AG hat als bevorzugter Ligand für CB2 eine niedrigere Affinität für CB1. Überdies gehört 2-AG zur Gruppe der Ester und ist das häufigste Endocannabinoid im Gehirn (Cota *et al.*, 2003a).

Weitere Endocannabinoide wie Noladinether (2-Arachidonylglycerolether), Virodhamin (O-Arachidonylethanolamid) oder γ -Linolenylethanolamid haben ebenfalls verschieden starke Affinitä-

ten zu den Cannabinoidrezeptoren und damit unterschiedliche Wirkungen. Eine Sonderstellung nehmen N-Palmitoylethanolamin und N-Oleylethanolamin ein. Ihre pharmakologischen Effekte können nicht aus einer Aktivierung der bekannten Cannabinoidrezeptoren resultieren und lassen die Existenz bisher noch nicht identifizierter Cannabinoidrezeptoren vermuten (Schneider *et al.*, 2005).

1.7.3 Regulation der Nahrungsaufnahme durch Endocannabinoide

Endocannabinoide und der Cannabinoidrezeptor 1 sind in hohem Maße im Hypothalamus nachgewiesen worden, einer Hirnregion, die, wie oben beschrieben, direkt die Nahrungsaufnahme und den Appetit reguliert (Cota *et al.*, 2003a). Ein besseres Verständnis der modifizierenden Wirkung der Endocannabinoide auf die Nahrungsaufnahme konnte mit Hilfe von Tiermodellen gewonnen werden. An Ratten wurde gezeigt, dass zerebrale Endocannabinoidspiegel durch Hunger und Sättigung beeinflussbar sind. Nahrungskarenz führt zu steigenden Spiegeln sowohl von Anandamid als auch von 2-AG im limbischen System sowie einem erhöhten Gehalt an 2-AG im Hypothalamus. Die hohen hypothalamischen 2-AG Spiegel sinken nach erneuter Nahrungsaufnahme wieder ab (Kirkham *et al.*, 2002).

Ein weiteres Tiermodell stellen Leptin-defiziente Mäuse (*ob/ob*-Mäuse) dar, die auf Grund des fehlenden leptinergen Sättigungssignals adipös sind. Sie weisen ebenfalls erhöhte Endocannabinoidspiegel im Hypothalamus auf. Die Gabe von Leptin führt bei ihnen zu einer verringerten Nahrungsaufnahme bei gleichzeitiger Reduktion der Anandamid- und 2-AG-Expression. Folglich führen fehlende Leptinsignale zu gesteigerten hypothalamischen Endocannabinoidspiegeln, während Leptin die Endocannabinoidkonzentration senkt. Das Endocannabinoidsystem stellt damit einen wichtigen Teil des leptinregulierten neuronalen Kreislaufs dar, der Appetit und Nahrungsaufnahme moduliert (Cota *et al.*, 2003a; Schneider *et al.*, 2005).

Ebenfalls signifikant niedrige Plasmaleptinspiegel haben Mäuse, denen der Cannabinoidrezeptor 1 fehlt (*Cb₁^{-/-}*). Doch im Gegensatz zu Leptin-defizienten Tieren zeigen sie einen dünnen Phänotyp mit vermindertem Körperfett und eine Resistenz gegenüber diät-induzierter Adipositas (Lichtman und Cravatt 2005). Während bei jungen Mäusen das niedrige Körpergewicht vorwiegend durch die verminderte Kalorienaufnahme erklärt werden kann, zeigen erwachsene Tiere eine in etwa gleich hohe Energieaufnahme wie Wildtypmäuse. Körpertemperatur und Energieverbrauch sind ebenfalls vergleichbar und erklären nicht den Gewichtsunterschied (Cota *et al.*, 2003b). Die Ursache des reduzierten Körpergewichts und der Adipositasresistenz liegt vermutlich in einer Veränderung des peripheren Energiemetabolismus.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass auch Adipozyten und Hepatozyten CB1 exprimieren. Die CB1-Aktivierung in isolierten Mäuse-Adipozyten steigert die Aktivität der Lipoproteinlipase und damit die Fettspeicherung (Engeli *et al.*, 2005). In der Leber führt Stimulierung von CB1 durch gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein 1c) zu einer Aktivierung der Acetyl-Coenzym-A Carboxylase-1 (ACC1) und der Fettsäuresynthase (FAS). Dies führt zu einer gesteigerten Neusynthese von Fettsäuren (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005). Zum Beispiel scheint das verminderte Körpergewicht bei CB1-defizienten Tieren sowohl durch zentrale hypothalamische Effekte beeinflusst zu sein als auch aus einer veränderten Hepatozyten- und Adipozytenfunktion zu resultieren (Cota *et al.*, 2003b).

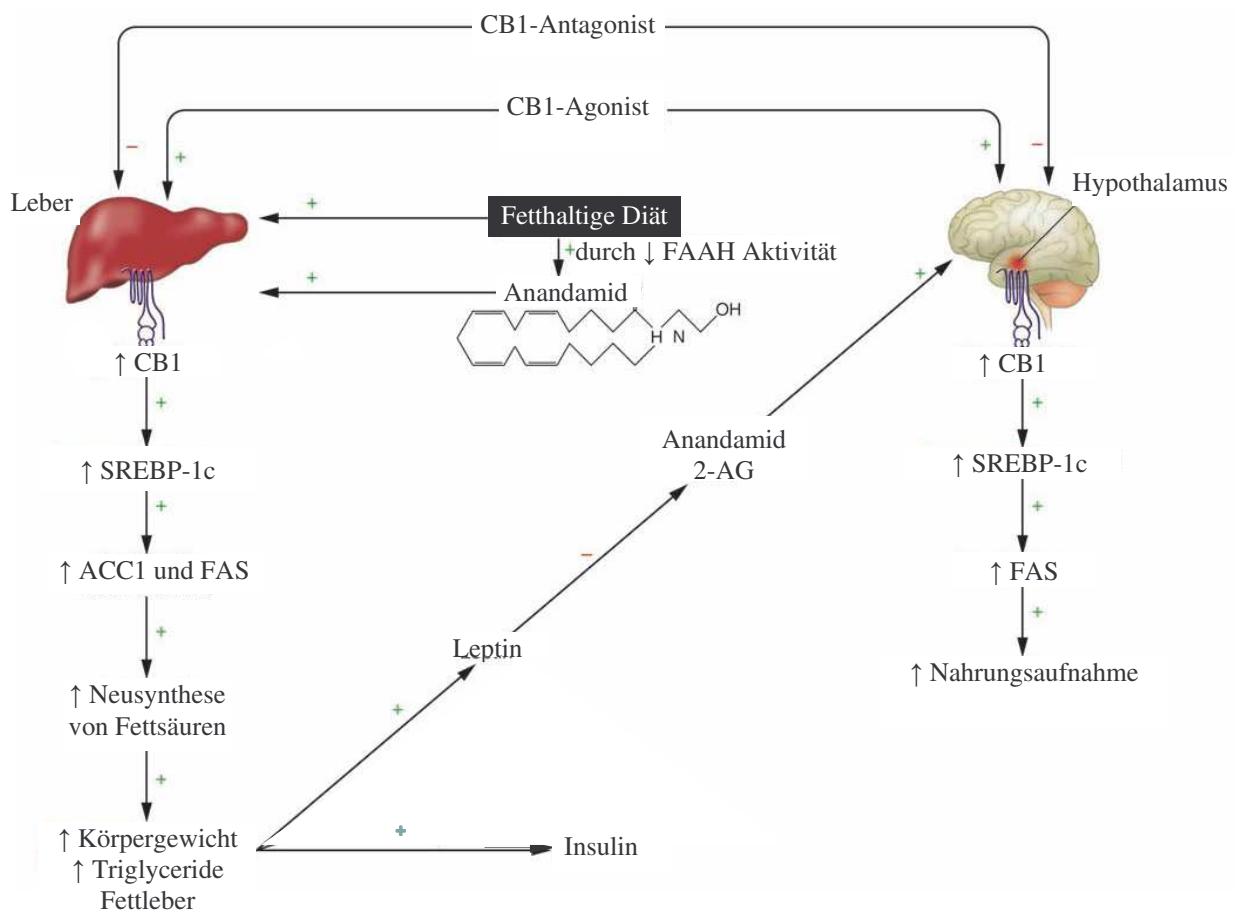


Abb. 1-5: Modell der Endocannabinoid-regulierten Signalwege: peripherer Metabolismus und zentrale Appetitregulation in Leber und Hypothalamus, CB1 = Cannabinoidrezeptor 1, SREBP-1c = sterol regulatory element-binding protein 1c, ACC = Acetyl-Coenzym-A Carboxylase-1, FAS = Fettsäuresynthase (modifiziert nach Lichtmann und Cravatt 2005).

Cannabinoidrezeptoren, insbesondere CB1, findet man auch im gesamten Gastrointestinaltrakt. Dort kommen sie zum Beispiel bei Hunden im unteren Ösophagussphinkter vor und verhindern bei Aktivierung eine Relaxation dieses Muskels. Damit wirken sie einem Sauerreflux entgegen. Eine

besonders hohe Dichte erreichen die Rezeptoren im Magen und im oberen Dickdarm, wo sie zum Teil in Neuronen mit dem Neuropeptid Y koexprimiert werden. Vermutlich sind beide Hormone an der Kontrolle der Magen-Darmfunktion beteiligt und beeinflussen sich gegenseitig. Es konnte ein Einfluss der Endocannabinoide auf die Motilität und die sekretorische Aktivität des Gastrointestinaltrakts bestätigt werden. Es zeigte sich eine hemmende Wirkung auf die Magenentleerung, die Darmmotilität und die Darmpassage. In Bezug auf Entzündungen des Gastrointestinaltrakts scheint das Endocannabinoidsystem einen protektiven Effekt zu haben (Friede 2007).

Des Weiteren ist das endogene Cannabinoidsystem mit dopaminergen, serotonergen und opioidergen Regelkreisen verbunden. Vor allem das opioide System weist einige wichtige funktionelle Überschneidungen mit dem Endocannabinoidsystem auf, einschließlich der Modifikation der Nahrungsaufnahme. Es konnte gezeigt werden, dass die Effekte eines CB1-Agonisten durch Naloxon, einen Opioidrezeptor Antagonisten, aufgehoben werden können. Scheinbar sind die Wirkungen von Naloxon, die die Nahrungsaufnahme hemmen, funktionell ähnlich zu denen von Cannabinoidrezeptor-Antagonist (Cota *et al.*, 2003a).

1.7.4 Der Cannabinoidrezeptor-1-Antagonist Rimonabant

In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Mäusen, denen der Cannabinoidrezeptor 1 fehlt, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen dünn und diätinduzierter Adipositas gegenüber resistent sind (Engeli *et al.*, 2005). Dies gilt auch für Tiere, die mit einem Antagonisten gegen Cannabinoidrezeptoren behandelt werden. Der bekannteste Antagonist ist der CB1-Blocker Rimonabant (SR141716). Er reduziert im Tiermodell die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht durch sowohl periphere als auch zentrale Wirkungen (Van Gaal *et al.*, 2005).

Ähnliche Effekte konnte van Gaal auch beim Menschen nachweisen. In einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie mit über 1500 übergewichtigen Patienten zeigte die Gruppe der mit Rimonabant Behandelten einen signifikant größeren Abfall des Körpergewichts nach einem Jahr. Des Weiteren konnte ein deutlicher Abfall des Taillenumfangs, der Triglyceride und der Insulin-Resistenz sowie ein Anstieg des HDL-Cholesterins beobachtet werden. Insgesamt wies die Gruppe der mit Rimonabant behandelten Patienten eine signifikante Reduktion der Prävalenz des Metabolischen Syndroms auf (Van Gaal *et al.*, 2005). Seit 2006 wurde Rimonabant unter dem Handelsnamen Akomplia® zur Therapie von Übergewicht und Adipositas angeboten. Doch in den letzten Jahren häuften sich Meldungen über unerwünschte Nebenwirkungen des CB1-Antagonisten. Christensen *et al.* publizierten 2007 eine Metaanalyse aller bis dahin veröffentlichten, randomisierten und kontrollierten Studien bezüglich Rimonabant. Die mit dem CB1-Anta-

gonisten behandelten Probanden wiesen neben einem um im Mittel 4,7 kg größeren Gewichtsverlust nach einem Jahr im Vergleich zur Placebo-Gruppe auch eine signifikant höhere Nebenwirkungsrate auf. Die Häufigkeit ernsthafter unerwünschter Wirkungen lag um das 1,4-fache höher als in der Placebogruppe. Am häufigsten traten psychiatrische Nebenwirkungen wie depressive Störungen oder Angsterkrankungen auf, in einigen Fällen kam es sogar zum Suizid (Christensen *et al.*, 2007). Daraufhin hat die EMEA (europäische Arzneimittelagentur, European Medicines Agency) im Oktober 2008 empfohlen, die Zulassung von Rimonabant in Europa ruhen zu lassen (EMA 2008).

1.7.5 Abbauende Enzyme im Endocannabinoidsystem

An der Inaktivierung als letzten Schritt im Metabolismus der Endocannabinoide sind verschiedene Proteine beteiligt. Vorab erfolgt die Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt durch einen bisher unbekannten Membrantransporter. Anschließend werden die Endocannabinoide durch zurzeit drei bekannte Hydrolasen abgebaut. Die Monoacylglycerollipase aus der Familie der Serin-Hydrolasen spaltet 2-Arachidonylglycerol in Arachidonsäure und Glycerol (Cota *et al.*, 2003a). Ein anderes Enzym, die N-acylethanolaminhydrolysierende Säureamidase (NAAA), inaktiviert vorzugsweise Anandamid. Dabei entstehen Arachidonsäure und Ethanolamin (Tsuboi *et al.*, 2007). Die gleiche Reaktion wird durch die Fettsäureamidhydrolase (FAAH) katalysiert (Schneider *et al.*, 2005). Sie hydrolysiert mit einem etwas anderen pH-Optimum N-Acylethanolamine in Neuronen ebenfalls in Fettsäureamide und Ethanolamin (Tsuboi *et al.*, 2007). In einigen Zellen ist das Enzym zugleich für den Abbau von 2-AG verantwortlich (Vandevor 2008). Da FAAH Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, soll es im Folgenden gesondert vorgestellt werden.

1.8 Fettsäureamidhydrolase (FAAH)

1980 beschrieben Schmid und Kollegen erstmals ein Enzym, das N-Acylethanolamide in ihre korrespondierenden Fettsäuren überführt. Etwas später wurde ein Protein mit ähnlichen Eigenschaften entdeckt, das Anandamid in Arachidonsäure umwandelt. Zufällig wurde von einem weiteren Enzym berichtet, das Oleamid abbaut. Aufgrund der Ähnlichkeiten dieser drei Katalysatoren in Gewebeverbreitung, Membranassoziation und Sensitivität zu bestimmten Inhibitoren nahm man an, dass es sich hierbei um ein und dasselbe Enzym handelt. Dies konnte in weiteren Untersuchungen bestätigt werden. Da dieses Protein eine große Zahl verschiedener Fettsäureamide degradiert, wurde es Fettsäureamidhydrolase genannt. Es gehört zu einer durch Amidase charakterisierten Familie von Enzymen, mit denen es eine streng homologe Sequenz von ca. 160 bp teilt. Bislang ist FAAH das einzige Protein dieser Gruppe, das man in Säugetieren gefunden hat (McKinney und Cravatt 2005). Das Enzym zeigt eine weite Verbreitung sowohl im Gehirn als auch

in der Peripherie, wie zum Beispiel in der Leber. Zentral ist es vor allem im Hypothalamus, im Hirnstamm, im Hippokampus und im zerebralen Kortex lokalisiert (Cravatt *et al.*, 2001).

1.8.1 Fettsäureamide

Die Substrate von FAAH, die Fettsäureamide, gehören ebenso wie die Sphingosin-1-Phosphate und die Lysophospholipide zu den Membranlipiden mit Signalwirkung und regulatorischer Funktion. Sie lassen sich in zwei Untergruppen einteilen: Zum einen die primären Fettsäureamide und zum anderen die N-Acylethanolamine. Ein Vertreter der ersten Gruppe ist zum Beispiel cis-9-Octadecenamid, besser bekannt als Oleamid. Der Effekt dieser Schlaf induzierenden Substanz kann durch die Gabe von CB1-Antagonisten aufgehoben werden. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass Oleamid an CB1 bindet. Zu der zweiten Gruppe, den N-Acylethanolamiden, gehören unter anderem die Endocannabinoide Anandamid, ebenfalls ein CB1-Agonist, und Palmitoylethanolamin (McKinney und Cravatt 2005).

1.8.2 Molekularer Aufbau und Struktur von FAAH

FAAH ist ein integrales Membranprotein bestehend aus zwei identischen Untereinheiten. Bei einem Molekulargewicht von je 63 kD sind die beiden FAAH-Monomere in ihrer Quartärstruktur parallel zu einem Homodimer angeordnet. Im Kern weisen sie eine β -Faltblattstruktur bestehend aus 11 Aminosäureketten auf, die von 24 α -Helices umgeben sind. Genauere Untersuchungen des Moleküls zeigten ein Helix-Drehung-Helix-Motiv aus Helix α 18 und α 19 (Aminosäure 410-438), das die für diese Enzym-Familie typische Faltung unterbricht und hauptsächlich aus hydrophoben Resten gebildet wird. Diese lipophile Domäne bedeckt die aktive Seite von FAAH und scheint für die Bindung an die Membran verantwortlich zu sein (Bracey *et al.*, 2002). Umgeben ist sie von basischen Aminosäuren, die wahrscheinlich die Interaktion mit negativ geladenen Phospholipiden erleichtern können. Insgesamt dient diese kompliziert gestaltete Integration von FAAH in die Lipiddoppelschicht vermutlich einer besseren Beweglichkeit der Fettsäureamide. Dadurch können diese direkt von der Zellmembran zum aktiven Zentrum gelangen ohne einen Transporter durch das wässrige Zytosol zu benötigen (McKinney und Cravatt 2005).

Das Enzym weist des Weiteren einige Kanäle auf, die einen Zugang sowohl zur Membran als auch zum Zytoplasma der Zelle ermöglichen. Einer der Kanäle grenzt an die eben beschriebene hydrophobe Domäne. Dieser denkbare Substrateingang ist amphipatisch, vermutlich um die Aufnahme und die Bewegung polarer Kopfgruppen der Fettsäureamide zum aktiven Zentrum des Enzyms zu ermöglichen (McKinney und Cravatt 2005). Ein zweiter Kanal zum aktiven Zentrum des Enzyms ist ebenfalls von hydrophoben Resten ausgekleidet. Er enthält einen Isoleucinrest (I491), der an der

Substraterkennung beteiligt sein soll. Ein dritter wichtiger Kanal in der FAAH Struktur geht vom aktiven Zentrum in einem Winkel von 80° von der substratbindenden Vertiefung aus und bildet eine Öffnung zum Zytosol. Insgesamt ergeben diese Kanäle ein Modell, in dem die Fettsäureamide durch die Zellmembran das aktive Zentrum erreichen. Die bei der anschließenden Hydrolyse entstehenden Fettsäuren (hydrophob) und Amine (hydrophil) werden dann durch den membranösen bzw. zytosolischen Zugangskanal freigesetzt. Die zytosolische Öffnung gewährleistet zusätzlich vermutlich den Durchlass für die benötigten Wassermoleküle (Bracey *et al.*, 2002).

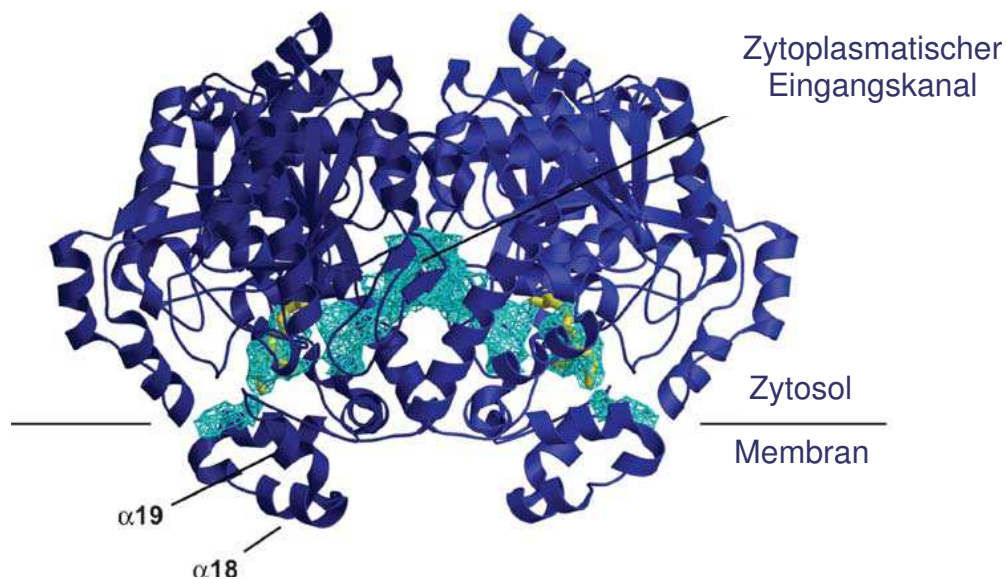


Abb. 1-6: Kristallstruktur eines FAAH-Dimers mit Kanälen (hellblau) und der mutmaßlichen membranbindenden Domäne ($\alpha 18$ - $\alpha 19$) (modifiziert nach McKinney und Cravatt 2005).

Die katalytische Aktivität im Kern des Enzyms beruht wahrscheinlich auf einem Serinrest (S241). Dies legt die Vermutung nahe, dass FAAH zu der Serin-Hydrolasen Superfamilie gehört. Weitere Studien zeigten jedoch, dass die typische Serin-Histidin-Aspartat-Trias, wie sie bei den meisten Serin-Hydrolasen zu finden ist, nicht vorliegt. Stattdessen entdeckte man einen konservierten Lysin-Rest (K142), der im Rahmen der Hydrolyse eine wichtige Funktion sowohl als Base als auch als Säure ausübt. Als Base spielt Lysin eine Rolle bei der Aktivierung von S241 und als Säure wirkt es an der Protonierung des Substrats mit. Insgesamt scheinen katalytische Effizienz und Selektivität von FAAH durch die Eigenschaften dieser Gruppe bedingt zu sein. Ein weiterer Serin-Rest (S217) ist wahrscheinlich ebenfalls von Bedeutung für die katalytische Aktivität von FAAH. Mutationen in diesem Bereich haben jedoch nicht so gravierende Auswirkungen wie bei den beiden Erstgenannten. Zusammen bilden diese drei Aminosäurereste eine funktionell wichtige Einheit im Molekül, die Serin-Serin-Lysin-Trias, die es dem Enzym ermöglicht sowohl Amide als auch Ester zu hydrolysieren (McKinney und Cravatt 2005).

1.8.3 Einfluss von FAAH auf Endocannabinoidspiegel

Aus den anfangs beschriebenen Studien ergeben sich Adipositasmodelle, in denen zerebrale Endocannabinoidspiegel erhöht sind (Engeli *et al.*, 2005). Ein Enzym, das Endocannabinoide degradiert und damit ihre Aktivität beendet, ist die Fettsäureamidhydrolase (Bracey *et al.*, 2002). Der Einfluss von FAAH auf die Endocannabinoidspiegel konnte sowohl durch Tiermodelle als auch mit Hilfe humaner Befunde genauer geklärt werden.

1.8.3.1 Tiermodelle

In Tiermodellen mit FAAH Knockout-(*Faah*^{-/-})-Mäusen erwiesen sich diese als lebensfähige, gesunde und fruchtbare Tiere. Gewebeproben zeigten jedoch eine 50- bis 100-fach reduzierte Hydrolyserate von FAAH. Folge davon waren bis zu 10-fach erhöhte Spiegel von Anandamid und anderen Fettsäureamiden (Cravatt *et al.*, 2001). Ebenso führt die Gabe von FAAH-Inhibitoren wie beispielsweise URB532 oder URB597 bei Nagern zu erhöhten endogenen Anandamidspiegeln im Gehirn. Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass FAAH *in vivo* das primär degradierende Enzym für die genannten Lipide ist (McKinney und Cravatt 2005). Dadurch kann dieses Protein sowohl die Dauer als auch das Ausmaß der Endocannabinoidsignale kontrollieren (Sipe *et al.*, 2005). Interessanterweise treten aber weder bei Gabe von FAAH-Inhibitoren noch bei *Faah*^{-/-}-Mäusen offenkundige Veränderungen in der körperlichen Aktivität (zum Beispiel Hypomotilität) oder im Appetit auf wie sie bei der Gabe direkter CB1-Agonisten typisch sind. Gibt man *Faah*^{-/-}-Tieren zusätzlich Anandamid, führt dies verglichen mit Wildtypmäusen zu einer deutlich stärkeren Ausbildung unter anderem von Hypomotilität, Analgesie und Hypothermie. Hemmen lassen sich diese Effekte durch einen CB1-Antagonisten (Cravatt *et al.*, 2001; McKinney und Cravatt 2005).

1.8.3.2 Humane Befunde

Neben den beschriebenen Beobachtungen in Tiermodellen gibt es Hinweise darauf, dass Endocannabinoide auch beim Menschen deutlich dem Einfluss von FAAH unterliegen. Engeli *et al.* konnten 2005 zeigen, dass adipöse Erwachsene in ihrem Fettgewebe neben erhöhten Endocannabinoidspiegeln einen um 59 % geringeren Gehalt an FAAH mRNA aufweisen. Diese verminderte FAAH-Genexpression könnte der Grund für die beobachteten endogenen Cannabinoidspiegel bei Übergewichtigen sein. Für Anandamid lagen sie um 32 % und für 2-AG um 52 % höher als bei normalgewichtigen Kontrollen. Ob Interaktionen mit Leptin zu der verringerten Expression von FAAH führen, genetische Faktoren oder andere Ursachen dafür verantwortlich sind, ist bisher nicht geklärt (Engeli *et al.*, 2005).

Einem anderen Ansatz gingen 2004 Chiang und Mitarbeiter nach. Sie untersuchten einen bereits bekannten Polymorphismus (rs324420) im kodierenden Bereich der *FAAH*, der zu einem Austausch von Prolin zu Threonin (Pro129Thr) führt, auf seine funktionelle Relevanz. Die betreffende Aminosäure befindet sich in einer oberflächlichen Schleife an der zytoplasmatischen Seite des Proteins. Um die Auswirkungen auf die biochemische und strukturelle Funktion von *FAAH* zu bestimmen, isolierten sie T-Lymphozyten von für das Threonin-Allel homozygoten Patienten. Die Blutzellen zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Lymphozyten eine um mehr als die Hälfte reduzierte Aktivität von *FAAH* einhergehend mit einer entsprechend verminderten Expression des Proteins. Ähnliche Ergebnisse brachten Untersuchungen an transfizierten COS-7 Zellen. Zellen mit der Pro129Thr-Variante wiesen signifikant niedrigere Enzymspiegel als solche mit Wildtyp-*FAAH* auf. Daraus lässt sich folgern, dass die beobachteten unterschiedlichen Expressionen kein zellspezifisches Phänomen sind (Chiang *et al.*, 2004).

1.8.4 Assoziationsstudien zu *FAAH* und Adipositas

Bislang sind genetische Polymorphismen im kodierenden Bereich von *FAAH* in Bezug auf Übergewicht beim Menschen nur in wenigen Studien untersucht worden. Diese konnten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse liefern. Sipe und Mitarbeiter analysierten den oben bereits beschriebenen Polymorphismus (rs324420) in 2.667 Probanden europäischer, afrikanischer und asiatischer Abstammung. Eine signifikante Assoziation von Thr129 mit Adipositas fanden sie in Europäern ($p = 0,0045$) und Afrikanern ($p = 0,049$). In der Gruppe der Asiaten hingegen wiesen die Normalgewichtigen etwas häufiger die Thr129-Variante auf als die Adipösen (Sipe *et al.*, 2005). 2007 untersuchten Jensen und Mitarbeiter denselben Polymorphismus in einem Kollektiv bestehend aus 5.801 Dänen. Sie fanden eine grenzwertige Assoziation von Pro129 mit Adipositas. Doch nach Korrektur für multiples Testen war das Ergebnis nicht signifikant. Insgesamt konnten sie keine Evidenz für eine Assoziation des Pro129Thr-Polymorphismus von *FAAH* mit Adipositas in der weißen Bevölkerungsgruppe finden (Jensen *et al.*, 2007). Monteleone *et al.* überprüften einen Zusammenhang zwischen dem Pro129Thr-Polymorphismus von *FAAH* und der „binge-eating“ Störung. Sie konnten an ihrem Kollektiv aus 115 übergewichtigen „binge-eating“ Patienten, 74 Übergewichtigen ohne „binge-eating“ Störung und 110 Normalgewichtigen eine signifikante Korrelation zwischen Thr129 und Übergewicht aber nicht mit einer „binge-eating“ Störung nachweisen (Monteleone *et al.*, 2008).

In einer weiteren Studie wurde ebenfalls der Polymorphismus rs324420 im *FAAH* sowie ein weiterer im *CBI* untersucht. Aberle *et al.* überprüften deren Einfluss auf BMI und Metabolismus unter einer Diät mit niedrigem Fettgehalt an 451 adipösen Probanden kaukasischer Herkunft. Träger des 1359G/A Polymorphismus im *CBI* zeigten keine signifikanten Veränderungen unter der

Diät im Vergleich zu Trägern der Wildtypvariante. Dagegen wiesen Träger von Thr129 verglichen mit homozygoten Wildtyp-Trägern einen signifikant stärkeren Abfall der Triglyceride und des Gesamtcholesterins auf. Beide Polymorphismen zeigten keine signifikanten Auswirkungen auf Veränderungen des BMIs (Aberle *et al.*, 2007). Der gleiche Polymorphismus im *FAAH* wurde von de Luis *et al.* in einem Kollektiv aus adipösen Frauen untersucht. Diese zeigten keine Unterschiede bezüglich Essverhalten und anthropometrischer Daten zwischen Wildtyp- und Mutations-trägern. Träger der Thr129-Variante zeigten jedoch eine signifikante Assoziation mit niedrigeren Insulin- und Glukosespiegeln sowie höheren Konzentrationen von Visfatin, einem in Adipozyten synthetisierten Protein (de Luis *et al.*, 2010). Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um Aussagen über die Bedeutung von *FAAH* bei der Entstehung von Adipositas beim Menschen machen zu können.

1.9 Ziel der Arbeit

Das Endocannabinoidsystem ist sowohl in peripheren als auch zentralen Regelkreisen an der Steuerung von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht beteiligt. Ein wichtiges Enzym im Metabolismus der Endocannabinoide stellt wie oben beschrieben die Fettsäureamidhydrolase dar. Basierend auf der Funktion von *FAAH* und den berichteten Assoziationsstudien soll in der vorliegenden Arbeit das Kandidatengen Fettsäureamidhydrolase in Hinblick auf eine mögliche Relevanz bei der Entstehung von Adipositas untersucht werden. Dafür wurde in einem Kollektiv aus extrem adipösen Kindern und Jugendlichen ein Mutationsscreening der kodierenden Region mit Hilfe von Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP) und denaturierender Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (dHPLC) in den Exons 3, 4, 7, 8, 11, 12 und 15 durchgeführt. Des Weiteren erfolgte die Genotypisierung neu detektierter bzw. bekannter Polymorphismen bei adipösen Probanden und ihren Eltern sowie bei über-, normal-, und untergewichtigen Kontroll-Personen mittels entsprechender Methoden (Polymerase-Kettenreaktion-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (PCR-RFLP) oder Tetra-Primer Amplification-Refractory-Mutation-System-Polymerase-Kettenreaktion (Tetra-Primer-ARMS-PCR)). Mit Hilfe von Assoziationsstudien sowie Tests auf Transmissions-Ungleichgewicht (TDT) sollte der Einfluss der gefundenen Varianten auf den Phänotyp bestimmt werden. Sowohl der Mutationsscreen als auch die Assoziationsstudien wurden in Zusammenarbeit mit Frau Jophia Carri durchgeführt. Sie geht in ihrer Dissertation (*FAAH*-Gen: Molekulargenetische Mutationsanalyse bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen) ausführlich auf die Ergebnisse in den Exons 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13 und 14 ein.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Tab. 2-1: Liste der verwendeten Geräte.

<u>Gerätebezeichnung</u>	<u>Funktion</u>	<u>Hersteller</u>
Varioklav 300 E	Autoklav	H+P Labortechnik AG (Oberschleißheim, D)
Transgenomic Wave	dHPLC-Gerät	Transgenomic (Cheshire, UK)
PTC-100	DNA- Thermocycler	MJ Research (Waltham, USA)
PTC- 200	DNA- Thermocycler (Gradientencycler)	MJ Research (Waltham, USA)
Öko Arktis	Eisschrank	AEG (Nürnberg, D)
Scotsman AP-80	Eismaschine	Frimont (Mailand, I)
HS6686	Eisschrank (-60 bis -86°C)	Hettich (Tuttlingen, D)
Pipetus forty	elektrische Saugpipette	Hirschmann (Heilbronn, D)
41-2340 Klasse II	Elektrophorese für Agarosegele	Peqlab (Erlangen, D)
Hoefer SE 600 Ruby	Elektrophorese für SSCP- Gele	Amersham BioScience (Pittsburg, USA)
Unigeldryer 3545 D	Geltrockner	LTF Labortechnik GmbH & Co KG (Wasserburg, D)
Purelab Ulta	Gerät zur Herstellung von Aqua dest.	ELGA (High Wycombe, UK)
Haake K20	Kühlgerät für SSCP	Kobe (Marburg, D)
Profi line	Kühlschrank	Liebherr (Lienz, A)
MR 3001	Magnetrührgerät	Heidolph (Kelheim, D)
MR 3002 Silumin	Magnetrührgerät	Heidolph (Kelheim, D)
MR 1000	Magnetrührgerät	Heidolph (Kelheim, D)
Vakuubrand MZ 2C AK EK	Membran- Vakuumpumpe	ABM (Greifenberg, D)

<u>Gerätebezeichnung</u>	<u>Funktion</u>	<u>Hersteller</u>
Mikrowelle Inverter	Mikrowelle	Panasonic (Hamburg, D)
8-Kanal-Ergopipette Comfort (5-50µl)	Pipette	IBS Integra (Femwald, D)
Micronic Systems (0,5-10µl)	Pipette	IBS Integra (Femwald, D)
Tip Stack Pack	Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Biosphere Filter Tips	Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Gyrotwister	Plattenschwenkgeräte	Labnet (Woodbridge, UK)
Rocky	Plattenschwenkgeräte	Labortechnik Fröbel GmbH (Lindau, D)
Vortex Mixer K	Schüttelgerät	Neolab (Heidelberg, D)
GFL 1083	Schüttelwasserbad	GFL MWH (Burgwedel, D)
Nanodrop 1000	Spectrophotometer	Peqlab (Erlangen, D)
G7883	Spülmaschine	Miele (Gütersloh, D)
EPS 601 Power Supply	Stromaggregat für Horizontal- Elektrophorese	Amersham BioScience (Pittsburg, USA)
pH 315i	Taschen pH-Meter	WTW (Wellheim, D)
Kelvitron T	Trockenschrank	Heraeus (Worms, D)
UV-Photosystem mit monochromer CCD-Kamera	UV-Leuchttisch mit Kamera	Peqlab (Erlangen, D)
PL 3002	Waage	Mettler- Toledo (Giessen, D)
Mikro 200	Zentrifuge	Hettich (Tuttlingen, D)
Megafuge 1.0	Zentrifuge	Heraeus (Worms, D)
Roland 460R	Zentrifuge	Hettich (Tuttlingen, D)

2.1.2 Chemikalien

Tab. 2-2: Liste der verwendeten Chemikalien.

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
100 bp DNA-Längenstandard	Peqlab (Erlangen, D)

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
Acetonitril	Roth (Karlsruhe, D)
Acrylamid-NN-Methylbisacrylamid (37,5:1)	Roth (Karlsruhe, D)
Agarose NEEO	Roth (Karlsruhe, D)
LE Agarose Seakem	Cambrex (Rockland, USA)
Aqua ad injectabile	Delta Select (Pfullingen, D)
Borsäure	Roth (Karlsruhe, D)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe, D)
DNA-Polimerisationsmix (dNTP)	Peqlab (Erlangen, D)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe, D)
Ethanol absolut	Roth (Karlsruhe, D)
Ethydiumbromid	Roth (Karlsruhe, D)
Ethylen-ediamin-tetraacetic-acid (EDTA)	Roth (Karlsruhe, D)
Ficoll (Type 400)	Amershan Biosciences (Uppsala, S)
Formaldehyd	Roth (Karlsruhe, D)
Formamid	Roth (Karlsruhe, D)
Glycerol	Roth (Karlsruhe, D)
Low DNA mass ladder	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Magnesiumchlorid	Sigma (Deisenhofen, D)
Natriumcarbonat	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Natrium-EDTA	Roth (Karlsruhe, D)
Pronase	Sigma (Deisenhofen, D)
Puffer 10x	Sigma (Deisenhofen, D)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden, D)
Salpetersäure	Roth (Karlsruhe, D)
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumdodecylsulfat)	Roth (Karlsruhe, D)
Silbernitrat	Roth (Karlsruhe, D)

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
Taq-Polymerase	Sigma (Deisenhofen, D)
Tetra-methyl-ethylendiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe, D)
Triethylamonium Acetat (TEAA)	Transgenomic (Cheshire, UK)
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	Roth (Karlsruhe, D)
Tris/HCl	Roth (Karlsruhe, D)
Xylene-Zyanol blau	Roth (Karlsruhe, D)

2.1.3 Puffer

2.1.3.1 Puffer für die DNA-Isolierung

1. <u>Red cell lysis buffer (RCLB), pH 7,6:</u>	Tris/HCl	10	mM
	MgCl ₂	5	mM
	NaCl	10	mM
2. <u>SE (Salzsäure-EDTA)-Puffer, pH 8,0:</u>	NaCl	75	mM
	Na ₂ EDTA	25	mM
3. <u>Pronase-Reaktionsmix (je Einzelprobe):</u>	SE-Puffer	5	ml
	SDS 10 %	5	µl
	Pronase 10 mg/ml	25	µl
4. <u>TE(Tris-EDTA)-Puffer, pH 8,0:</u>	Tris/HCl	10	mM
	EDTA	1	mM

2.1.3.2 Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

1. <u>10 x TBE (ad 1 l):</u>	Tris-Base	108	ml
	Borsäure	55	g
	EDTA	8,3	g
	Aqua bidest.	ad 1	l
2. <u>Auftragspuffer:</u>	Ficoll	15	% (w/v)
	Bromphenolblau	0,25	% (w/v)
	Xylen Zyanol	0,25	% (w/v)

2.1.3.3 Puffer für die Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP)

1. 10 x TBE (siehe 2.1.3.2)

2. Auftragspuffer:

EDTA (0,5 M)	8	ml
deionisiertes Formamid	190	µl
Glycerin	2	ml
Bromphenolblau	50	mg
Xylen Zyanol	50	mg
Aqua bidest.	ad 200	ml

3. Silberfärbung:

- I. Fixierer:

Ethanol	10	% (v/v)
Eisessig	0,5	% (v/v)

- II. Entwickler:

Natriumcarbonat	28	mM
Formaldehyd	0,01	% (v/v)

2.1.3.4 Puffer für die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

1. Puffer A

Triethylammonium-Acetat (TEAA), 2 M	50	ml
Acetonitril	250	µl
Aqua bidest.	ad 1	l

2. Puffer B

Triethylammonium-Acetat (TEAA), 2 M	50	ml
Acetonitril	250	ml
Aqua bidest.	ad 1	l

3. Puffer C

Acetonitril	750	ml
Aqua bidest.	ad 1	l

4. Puffer D

Acetonitril	80	ml
Aqua bidest.	ad 1	l

2.1.4 Oligonukleotide und Restriktionsenzym

2.1.4.1 Oligonukleotide

Tab. 2-3: Eingesetzte Primer für die PCRs (T_{ann} = Annealingtemperatur).

<u>Exon</u>	<u>Oligonukleotidname</u>	<u>Oligonukleotidsequenz</u>	<u>T_{ann}</u>	<u>Länge</u>
1	FAAH-Exon1CpG	CTTCAGCATTTGGGGCTCT	63 °C	691 bp
	FAAH-Exon1CpG	GGCTCAGAAAGTGCGGAATA		
	FAAH-Exon1.neu F	GCCGCCTCTGATAGCCTCTA	60 °C	495 bp
	FAAH-Exon1.neu2 R	AGGGCAAGGAGAGATTCTGG		
3	FAAH-Exon3 F	TTAAAAGGCCAGTTCTACATGAT	60 °C	300 bp
	FAAH-Exon3 R	ATGACCCAAGATGCAGAGCA		
4	FAAH-Exon4 F	GTTGTTGGAGTGGACCCTTG	65 °C	299 bp
	FAAH-Exon4 R	TGCAGTCATAGCTGGAGGAG		
7	FAAH-Exon7 F	GCTGCTCTAGGTCTGGGTTC	65 °C	290 bp
	FAAH-Exon7 R	GACGGTTCTCAGGAGACAGG		
7.neu	FAAH-Exon7.neu F	GTCCGTGGTGCTCTCAGTG	64 °C	386 bp
	FAAH-Exon7 R	GACGGTTCTCAGGAGACAGG		
8	FAAH-Exon8 F	TGTGTCTGGGGCTGAGTAGTT	62 °C	293 bp
	FAAH-Exon8 R	TAGCCATGGGTACCAGGAAG		
11	FAAH-Exon11 F	TTGGCCTGAAGAAGGTTGAC	57 °C	179 bp
	FAAH-Exon11 R	ACTACCCAGACCCAGACTCG		
12	FAAH-Exon12 F	AGGGGTCTGATGTTGCTGAT	58 °C	231 bp
	FAAH-Exon12 R	GGATGACAGGCCAGTCTAGG		
15.1b-2b	FAAH-Exon15-Fragm1b F	CCTACGTTGTGGCCTCTCTC	62 °C	438 bp
	FAAH-Exon15-Fragm2b R	GGGTGGAGGGATCAGGAC		
15.3b	FAAH-Exon15-Fragm3b F	CTCTGCAGCCCAGCCTAGT	64,8 °C	361 bp
	FAAH-Exon15-Fragm3b R	GTCTCCTGCTCCACAACCTC		

2.1.4.2 Restriktionsenzyme

Tab. 2-4: Eingesetzte Restriktionsenzyme. Exon1 wurde durch *CfrI* für die SSCP in kürzere Fragmente geschnitten. *BccI* und *Eco120I* wurden für die RFLP verwendet.

Fragment	Enzym	Erkennungssequenz	Puffer
Intron 1 und Exon 15.3b	<i>BccI</i> (<i>Bacteroides caccae</i>) (4 U/μl)	5'...CCATC (N) ₄ ...3' 3'...GGTAG (N) ₅ ...5' ▼ ▲	<u>NEBuffer 1 (pH 7,0; 10x):</u> 10 mM Bis Tris Propane HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM Dithiothreitol (DTT) <u>BSA (100x)</u>
Exon 1	<i>CfrI</i> (<i>Ciprobacter freundii</i>) (10 U/μl)	5'...C CTTGG ...3' 3'...GGAAC C...5' ▼ ▲	<u>Buffer Tango (10x):</u> 33 mM Tris-acetat (pH 7,9) 10 mM Mg-acetat 66 mM Kaliumacetat 0,1 mg/ml BSA
Exon 3	<i>Eco130I</i> (<i>Escherichia coli</i>) (2 U/μl)	5'...Py GGCC Pu...3' 3'...Pu CCGG Py...5' ▼ ▲	<u>Buffer 0 (10x):</u> 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 0,1 mg/ml BSA

2.2 Probandenkollektiv

Die Kollektive setzen sich aus adipösen, normal- und untergewichtigen Probanden zusammen, die von Mitarbeitern der klinischen Forschergruppe an folgenden Kliniken rekrutiert wurden (Hinney *et al.*, 1997):

- ◆ Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie und -psychotherapie der Philipps-Universität in Marburg
- ◆ Klinik Hochfried, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin in Murnau
- ◆ Medinet Spessart-Klinik in Bad Orb
- ◆ Adipositas Rehabilitationszentrum INSULA in Berchtesgaden

Für die einzelnen Studiengruppen galten folgende Einschlusskriterien:

- ◆ Gruppe der übergewichtigen und adipösen Kinder und Jugendlichen: BMI \geq 90. Perzentile
- ◆ Gruppe der übergewichtigen und adipösen Erwachsenen: BMI \geq 30 kg/m²
- ◆ Gruppe der normalgewichtigen Kontrollen: BMI zwischen der 40. und 60. Perzentile

- ◆ Gruppe der untergewichtigen Kontrollen: $\text{BMI} \leq 15$. Perzentile und Ausschluss einer Essstörung

Nicht mit in die Studiengruppen aufgenommen wurden Patienten, für die eines der folgenden Ausschlusskriterien zutraf:

- ◆ Vorliegen organischer Erkrankungen, die das Körpergewicht beeinflussen
- ◆ Bestehen eines Nikotinkonsums von >10 Zigaretten pro Tag
- ◆ Therapie mit einer Dauermedikation, die das Körpergewicht beeinflusst (ausgenommen Kontrazeptiva)

Für Trio-Analysen wurden auch die Eltern der adipösen Index-Patienten mit einbezogen. Für sie galten bei der Rekrutierung keine einschränkenden Bedingungen. Von der Familienuntersuchung ausgeschlossen wurden solche, bei denen Vater- und/oder Mutterschaft nicht mit den Vererbungsregeln nach Mendel vereinbar waren. Dies wurde mittels vorangegangener Typisierungen von SNPs und Mikrosatelliten überprüft.

Tab. 2-5: Deskriptive Statistik der Studiengruppen (*SD* = Standardabweichung, *NG* = Normalgewicht, *UG* = Untergewicht).

<u>Studiengruppe</u>		<u>Anzahl</u>	<u>Geschlecht</u>	<u>Alter [Jahren]</u> <u>$\bar{x} \pm \text{SD}$</u>	<u>BMI [kg/m²]</u> <u>$\bar{x} \pm \text{SD}$</u>	<u>Perzentile</u> <u>$\bar{x} \pm \text{SD}$</u>
Trios	Index	270	115 (m) 155 (w)	$14,07 \pm 2,99$	$32,62 \pm 6,25$	$99,09 \pm 1,82$
	Eltern	540	270 (m) 270 (w)	$43 \pm 6,31$	$30,07 \pm 6,26$	$79,42 \pm 25,59$
Adipöse Erwachsene		985	360 (m) 625 (w)	$46,31 \pm 14,74$	$36,04 \pm 5,93$	
Kontrollen (NG u. UG)		588	234 (m) 354 (w)	$25,25 \pm 4,42$	$19,34 \pm 1,94$	$18,47 \pm 21,22$
Screening-Kollektiv		92	37 (m) 55 (w)	$14,13 \pm 3,08$	$33,61 \pm 7,21$	$99,2 \pm 1,88$

Mit den Probanden und gegebenenfalls ihren Eltern wurden semistrukturierte Interviews zur Gewichtsanamnese, Erfassung soziodemographischer Daten und organischer Erkrankungen durchgeführt. Des Weiteren wurden zur phänotypischen Charakterisierung der Essstörung Fragen aus dem Composit International Diagnostic Interviews (CIDI, Sektion Essstörungen; WHO1990) gestellt. Alle Probanden und bei Minderjährigen mindestens ein Erziehungsberechtigter wurden über die Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme. Die Studie steht in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und wurde von den Ethikkommissionen der Universitäten Marburg und Duisburg-Essen bewilligt.

Das Screening-Kollektiv besteht aus einer Teilmenge der adipösen Indexpatienten der Trio-Studiengruppe. Bei der Genotypisierung der Trios zeigte von insgesamt fünf im *FAAH*-Gen lokalisierten SNPs derjenige im 3' Bereich nach Exon 15 (rs2295632) im Transmissions-Ungleichgewichtstest (TDT) den niedrigsten p-Wert ($p = 0,05$ in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe). Demzufolge wurden diejenigen Probanden ausgewählt, die maßgeblich zu diesem Ergebnis beitrugen: 17 homozygote Träger des Guanin-Allels (GG) mit heterozygoten Eltern, 4 heterozygote Träger (GT) mit einem heterozygoten und einem für das T-Allel homozygoten Elternteil sowie 59 homozygote Träger des Guanin-Allels (GG) mit einem heterozygoten und einem für das G-Allel homozygoten Elternteil. Zum Auffüllen der 96-er Platte wurden weitere 12 heterozygote Träger des G-Allels mit heterozygoten Eltern in den Screen mit einbezogen, obwohl sie das Ergebnis des TDT nicht maßgeblich beeinflussten.

2.3 Gewinnung und Aufarbeitung der DNA-Proben

2.3.1 Isolierung genomischer DNA

Die DNA-Extraktion erfolgte entsprechend einem modifizierten Protokoll nach Miller (Miller *et al.*, 1988). Dafür wurden 10-20 ml antikoaguliertes EDTA-Blut vermischt mit 30 ml eisgekühltem Erythrozyten-Lysepuffer (RCLB) auf Eis 15 Minuten inkubiert. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Leukozyten durch fünfzehnminütige Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C sedimentiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen Erythrozytentrümmern wurde verworfen. Das übrig gebliebene Leukozytensediment wurde erneut in 25 ml RCLB gewaschen und das Gemisch bei 4 °C und 4.000 rpm 15 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 5,5 ml Pronase-Reaktionsmix gelöst und über Nacht im Wasserbad bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

Um den proteolytischen Abbau der Zellproteine zu beschleunigen, erfolgten am Morgen die Zugabe von 5,5 ml SE-Puffer und eine wiederholte Inkubation für mindestens 10 Minuten unter ständigem Schütteln im Wasserbad bei 55 °C. Anschließend wurden zur Ausfällung der Proteine 2,5 ml

NaCl-Lösung (5 M) zu der Lösung gegeben und 15 Sekunden lang gevortext. Dann wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur und 4000 rpm zentrifugiert, um die durch die Salzlösung gefällten Proteine zu sedimentieren. Der danach die DNA enthaltende Überstand wurde in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und mit dem 2,5-fachen Volumen eiskalten absoluten Ethanols gefällt. Nach ca. 30 Minuten konnte die DNA mit einem Glashaken aufgenommen, kurz in 70 %-igem Ethanol gewaschen und in TE-Puffer 1-2 Stunden im Wasserbad bei 50 °C gelöst werden.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung und Verdünnung

Um für die PCR einheitlich konzentrierte DNA-Lösungen verwenden zu können, wurde die Konzentration in einem Spektralphotometer gemessen. Der dort ebenfalls bestimmte Quotient E_{260}/E_{280} (Extinktion bei 260 nm zu Extinktion bei 280 nm) gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der Probe. Idealerweise sollte er zwischen 1,8 und 2 liegen. Für eine Verunreinigung durch RNA spricht ein Quotient größer als 2,0. In diesem Fall kann Ribonuklease hinzugegeben werden, die selektiv Ribonukleinsäuren abbaut. Ist das Verhältnis kleiner als 1,8, liegt vermutlich eine Verunreinigung mit Proteinen vor und es muss gegebenenfalls mit dem Pronase-Reaktionsmix nachbehandelt werden. War der gewünschte Reinheitsgrad erreicht, wurde ein Teil der DNA-Lösung mit sterilem Aqua bidest. auf eine Endkonzentration von 20 ng/μl verdünnt. Sowohl die Verdünnung als auch die ursprünglichen Lösungen wurden bei -80 °C gelagert. Für die weitere Verwendung wurden Teile der DNA-Verdünnungen auf Mikrotiterplatten mit je 96 Wells pipettiert und bei -20 °C gelagert.

2.4 In-vitro Amplifizierung von DNA

2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine *in vitro* Methode zur exponentiellen Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte (Mullis und Faloona 1987). Neben der Ausgangs-DNA (template) benötigt man zwei entsprechende Oligonukleotid-Primer, eine thermostabile DNA-Polymerase (z.B. die *Taq*-Polymerase), Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), Puffer und als Cofaktor Mg^{2+} -Ionen. Die PCR läuft in drei aufeinander folgenden, sich zyklisch wiederholenden Schritten ab: Denaturierung, Annealing (Oligonukleotidanlagerung) und Elongation (Strangsynthese).

2.4.1.1 Durchführung der PCR

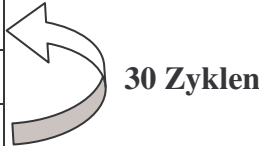
Die Durchführung erfolgte nach einem Standardprotokoll in folgender Reihenfolge:

Tab. 2-6: Reaktionsansatz einer Standard-PCR..

<u>Reagenz</u>	<u>Menge pro 25 µl Ansatz</u>	<u>Endkonzentration</u>
DNA (20 ng/µl)	2,5 µl	2,0 ng/µl
Aqua bidest.	ad 25 µl	
PCR-Puffer (10 x)	2,5 µl	1 x
MgCl₂ (25 mM)	1-2 µl	1-2 pmol/µl
Vorwärts-Oligonukleotid (25 pmol/µl)	0,25 µl	0,5 pmol/µl
Rückwärts-Oligonukleotid (25 pmol/µl)	0,25 µl	0,5 pmol/µl
dNTPs (20 mM)	0,25 µl	0,02 pmol/µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl	1,5 U

Tab. 2-7: PCR-Programm für einen Thermocycler.

	<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>
1. initiale Denaturierung	5 min	94 °C
2. Denaturierung	30 s	94 °C
3. Annealing	30 s	Annealingtemperatur
4. Elongation	30 s	72 °C
5. finale Elongation	10 min	72 °C
6. Kühlung	∞	4 °C




2.4.1.2 Spezifitätssteigernde PCR-Programme

1. Nested-PCR (= verschachtelte PCR): Zunächst wird eine normale PCR durchgeführt. Das dabei amplifizierte Produkt ist Ausgangs-template für eine weitere PCR mit anderen Oligonukleotiden. Dabei liegt das zweite Oligonukleotidpaar auf dem DNA-Strang zwischen dem ersten Paar. Da durch die erste Amplifizierung die Konzentration des Produktes sehr hoch ist, wurden davon jeweils nur 0,1 µl für den neuen PCR-Ansatz verwendet. Mit diesem Verfahren kann die Vermehrung unspezifischer Produkte auf ein Minimum begrenzt werden, da falsche Amplifikationsprodukte der ersten PCR hinwegselektiert werden (Mülhart 2003).
2. Touch-down-PCR: Dieses PCR-Programm startet mit einer Annealingtemperatur, die über der für die Oligonukleotid-Primer erwarteten liegt. Durch die hohe Anlagerungstemperatur in den ersten Zyklen wird eine unspezifische Oligonukleotidbindung weitgehend verhindert. Dadurch dominieren die PCR-Produkte mit der Zielsequenz (Strachan and Read 1999).

Der zu vervielfältigende Abschnitt von Exon 1 liegt innerhalb einer CpG-Insel (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin). Dies sind DNA-Abschnitte von 0,5-2 kb Länge, die einen erhöhten GC-Gehalt über 60 % aufweisen und dadurch oft schwierig zu denaturieren sind. Deshalb erfolgte die Amplifikation des ersten Exons mit Hilfe einer Touchdown-PCR unter Zugabe von 1 µl DMSO. Anschließend wurden die amplifizierten Produkte verdünnt und entsprechend einer Nested-PCR mit dem inneren Oligonukleotid-Paar erneut vervielfältigt. Um geeignete Amplikonlängen für die SSCP zu erhalten, mussten die PCR-Produkte später durch das Restriktionsenzym *Cfr*I geschnitten werden.

Tab. 2-8: PCR-Programm der Touchdown-PCR von Exon 1.

	<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>	
1. initiale Denaturierung	60 s	93 °C	
2. Denaturierung	60 s	95 °C	
3. Annealing	30 s	60 °C	
4. Elongation	90 s	72 °C	
5. Denaturierung	60 s	95 °C	
6. Annealing	30 s	63 °C	
7. Elongation	90 s	72 °C	
8. finale Elongation	5 min	72 °C	
9. Temperatursenkung	10 min	18 °C	
6. Kühlung	∞	4 °C	



5 Zyklen

30 Zyklen

2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Nach Amplifizierung der DNA-Sequenzen wurde zur Auftrennung und Identifizierung der Nukleinsäurefragmente eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Bei diesem molekularbiologischen Verfahren wandern die Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Spannungsfeld. Da die Phosphatgruppen der Phosphorsäureester bei neutralem pH-Wert negativ geladen sind, liegen Nukleinsäuren als polyanionische Moleküle vor und wandern in Richtung Anode. Die zurückgelegte Wegstrecke ist dabei umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare und damit zur Länge der Fragmente (Helling *et al.*, 1974). Der Grund dafür liegt in der Struktur der Agarose, deren Poren kleineren Fragmenten weniger Widerstand bieten. Dadurch können sie die Agarose schneller durchlaufen. Des Weiteren hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der Stromstärke, den Pufferbedingungen und der Agarose-Konzentration ab. Letztere beeinflusst außerdem über die Porenweite der Matrix die Trennschärfe der Gel-Elektrophorese. Mit steigender Konzentration der Agarose wird die Matrix engmaschiger und die Trennschärfe genauer.

2.5.1 Herstellung von Agarose-Gelen

Zur Auftrennung der 150 bis 500 bp langen DNA-Fragmente wurde ein 2,5 %-iges Agarose-Gel verwendet. Für dessen Herstellung wurden 12,5 g Agarose in 500 ml TBE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurden 15 µl Ethidium-Bromid hinzu gegeben und das Gemisch in eine bereitgestellte Gelkammer gegossen.

2.5.2 Durchführung der Gel-Elektrophorese

Das fertige Agarose-Gel wurde in horizontale, mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammern gebracht. Zur Erhöhung der Dichte der Proben und Erleichterung des Absinkens in die Taschen, wurden die Proben, mit 1/6 Volumen Auftragspuffer versetzt, in die Geltaschen pipettiert. Ein aufgetragener Längenstandard diente zur Größenabschätzung der aufgetrennten DNA-Fragmente. Die Laufzeiten betrugen zwischen 20 Minuten und 2 Stunden bei einer Gleichspannung von ca. 200 V. Der dem Gel hinzugefügte Farbstoff Ethidium-Bromid interkaliert in die DNA-Doppelhelix und besitzt die Eigenschaft unter UV-Licht zu fluoreszieren. Dadurch konnten die DNA-Banden mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.6 Methoden des Mutationsscreenings

2.6.1 Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP)

Die Einzelstrang-Konformationsanalyse (Single-stranded conformation polymorphism (SSCP) analysis) ist eine Methode zur Erkennung von Sequenzvarianten in bestimmten Genabschnitten (Orita *et al.*, 1989). Dabei werden die doppelsträngigen PCR-Amplifikate durch Hitzedenaturierung voneinander getrennt und in einem nicht-denaturierenden Gel elektrophoretisch getrennt. Da Nukleinsäuren eine starke Neigung haben Basenpaarungen einzugehen, nehmen die Einzelstränge hoch komplexe, nicht vorhersagbare Konformationen ein. Diese dreidimensionale Tertiärstruktur beruht auf der Primärstruktur des jeweiligen Stranges und ist somit spezifisch für die zugrunde liegende Basensequenz. Bereits die Veränderung einer einzigen Base kann zu einer Konformationsänderung führen und dadurch die Laufeigenschaften des Fragments beeinflussen. Je nach Tertiärstruktur wandern die Einzelstränge unterschiedlich schnell durch die Polyacrylamid-Gelmatrix, was zu einem individuellen Bandenmuster führt (Hoshino *et al.*, 1992). Die DNA-Einzelstränge können eine oder mehrere Konformationen annehmen. Dies hat zur Folge, dass auch homozygote Proben ein Muster aus mehreren Banden erzeugen können. Deshalb sollte, wenn möglich, immer eine Wildtyp-Probe als Kontrolle mitlaufen. Da man von dem Bandenmuster nicht auf die zugrunde liegende Art und Lokalisation der Mutation schließen kann, folgt anschließend eine Sequenzierung des abweichenden PCR-Amplifikats. Dadurch kann die Basenveränderung spezifiziert werden.

Diese sehr sensitive Methode ermöglicht es 70 - 95 % der Varianten in PCR-Fragmenten von bis zu 200 bp Länge zu entdecken (Grompe 1993). Mit zunehmender Größe der PCR-Produkte reduziert sich die Sensitivität, so dass bei diesen zuvor ein Restriktionsverdau durchgeführt werden sollte. Entscheidend für die Detektion von Mutationen sind außerdem die gewählten Elektrophoresebedingungen (Temperatur, Puffersystem, Gelzusammensetzung, angelegte Spannung und Laufdauer). Durch die Wahl zweier verschiedener Laufbedingungen lässt sich die Sensitivität auf bis zu 98 % erhöhen (Sheffield *et al.*, 1993).

2.6.1.1 Herstellung eines Polyacrylamidgels

Die Gelmatrix für die Polyacrylamidgele wurde aus Acrylamid-Bisacrylamid Lösung (37,5:1) hergestellt. Für einen 50 ml Ansatz eines 15 %-igen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgels wurden die angegebenen Lösungen in folgender Reihenfolge in ein 50 ml Falcon Röhrchen pipettiert:

Tab. 2-9: Reaktionsansatz für ein 15 %-iges Polyacrylamidgel.

Reagenz	Menge pro 50 ml Ansatz
Acrylamid-Bisacrylamid (40 %, 37,5 : 1)	18,75 ml
10 x TBE	2,5 ml
Aqua bidest.	28,75 ml
Ammoniumperoxidsulfat (APS, 10 %)	500 µl
TEMED	34 µl

Der Ansatz wurde vorsichtig geschwenkt, so dass keine Luftblasen entstanden. Durch Zugabe von Ammoniumperoxidsulfat (APS, 10 %) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) zum Acrylamid-Bisacrylamid-Gemisch wurde die Polymerisation gestartet. Das noch flüssige Gemisch wurde zwischen zwei Glasplatten mit einer Schichtdicke von 1 mm und einer Länge von 16 cm gegossen. Als Platzhalter für die benötigten Geltaschen dienten dabei eingesetzte Kämme. Nach einer Polymerisationszeit von zwei Stunden konnte das Gel mit den Proben beladen werden.

2.6.1.2 Durchführung der SSCP

Die SSCP diente der systematischen Suche nach Sequenzvarianten in den amplifizierten Exons des Fettsäureamidhydrolase-Gens. Für die Denaturierung wurden jeweils 10 µl PCR-Produkt mit je 10 µl Auftragspuffer versetzt und fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurde der Proben-Mix umgehend auf Eis gestellt, um das Renaturieren der DNA-Einzelstränge zu verhindern. Von jedem Ansatz wurden jeweils 10 µl in die entsprechenden Taschen des SSCP-Gels aufgetragen.

Die Auftrennung der DNA-Einzelstränge erfolgte unter optimierten Bedingungen (s. Tab. 2-9) in einer vertikalen Gel-Elektrophorese-Kammer. Als Elektrophorese-Laufpuffer diente 0,5 x TBE-Puffer. Da die Konformationsbildung und damit das Laufverhalten temperaturabhängig sind, wurde jedes PCR-Fragment bei Raumtemperatur und bei 4 °C analysiert, um eine höhere Sensitivität zu erreichen. Die SSCP-Bedingungen für die Exons 2, 5, 6, 13 und 14 können nachgelesen werden in der Dissertation von Frau Jophia Carri (FAAH-Gen: Molekulargenetische Mutationsanalyse bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen).

Tab. 2-10: SSCP-Bedingungen der untersuchten Exons.

PCR-Fragment	Gelmatrix [%]	Temperatur	Laufzeit [h]	Spannung [V]
Exon 1	15	4 °C	18	300
		RT	5	500
Exon 3	15	4 °C	18	300
		RT	5	500
Exon 4	15	4 °C	18	300
		RT	5	500
Exon 8	15	4 °C	18	300
		RT	5	500
Exon 11	15	4 °C	18	300
		RT	5	500
Exon 12	15	4 °C	18	300
		RT	5	500
Exon 15.1b-2b	15	4 °C	18	300
		RT	5	500
Exon 15.3b	15	4 °C	17,5	300
		RT	4	500

2.6.1.3 Silberfärbung

Das anschließende Detektieren der DNA ist durch die Silbernitratfärbung nach Budowle möglich (Budowle *et al.*, 1991). Fragmente ab einer Länge von 50 bp lassen sich so anfärben, kürzere sind aufgrund der zu geringen DNA-Menge nicht eindeutig darstellbar. Zunächst wurde das Gel für etwa zehn Minuten in einprozentiger Salpetersäure geschwenkt und dann mit Aqua bidest. gewaschen. Die Färbung erfolgte in einer 12 mM Silbernitratlösung für 20-30 Minuten. Dabei lagern sich die Silberkationen an die negativ geladene DNA an. Unspezifisch gebundene Silberionen wur-

den anschließend durch gründliches Spülen mit Aqua bidest. entfernt. Die nachfolgende Entwicklerlösung aus Natriumcarbonat und Formaldehyd diente der Reduktion des Silbers, was zum Anfärben der DNA-Banden führte. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 10 %-iger Essigsäure gestoppt. Um ein Reißen der Gele bei der Trocknung zu verhindern, wurden diese in 3 %-igem Glycerin geschwenkt. Abschließend wurden sie auf Filterpapier transferiert und in einem Vakuum-Geltrockner bei 70 °C etwa drei Stunden getrocknet.

2.6.2 Denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Das Prinzip der denaturierenden Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (dHPLC) basiert auf den unterschiedlichen thermodynamischen Eigenschaften von Homoduplexes mit komplementär gepaarten Basenpaaren auf der einen und Heteroduplex-DNA mit mindestens einer Basenfehlpaarung auf der anderen Seite. Das Verfahren ist eine Kombination aus Heteroduplexanalyse und Säulenchromatographie.

Die zu untersuchende Substanz, hier die DNA, wird zusammen mit einem Laufmittel, der mobilen Phase, durch eine die stationäre Phase enthaltende Trennsäule gepumpt. Die bei diesem Verfahren angewandte Ionenpaar-Umkehrphasen Chromatographie benutzt eine unpolare stationäre Phase, die aus alkylierten, hydrophoben Polystyren-Divinylbenzol (PS/DVB) Partikeln besteht. Letztere interagieren mit den hydrophoben Resten des Triethylammonium-Acetats (TEAA), das zusammen mit Acetonitril die mobile Phase bildet. Dadurch können sich die negativ geladenen Phosphatgruppen der partiell denaturierten DNA an die positiven Ammonium-Gruppen der Triethylammonium-Ionen anlagern. Im so genannten linearen Acetonitril-Gradientenverlauf ändert sich die Konzentration der einzelnen Puffer unter Zunahme des Acetonitrils. Dadurch wird das Laufmittel polarer als die Matrix und die Anziehung zwischen den TEAA-Ionen und den DNA-Duplexes nimmt ab. Die DNA-Fragmente lösen sich von der Säule ab. Je länger die DNA-Fragmente sind, desto später werden sie eluiert.

Bei einem heterozygoten Mutationsträger sind Wildtyp- und mutierte DNA im Verhältnis 1:1 vorhanden. Nach Denaturierung mit anschließender langsamer Renaturierung entstehen Homo- und Heteroduplexes in gleicher Menge (Abb.2-2). Da Heteroduplexes aus zwei komplementären DNA-Einzelsträngen bestehen, die sich durch mindestens einen Basenaustausch unterscheiden, bilden sie an mindestens einer Stelle eine Basenpaar-Fehlanelagerung („mismatch“). In diesem Bereich entsteht an Stelle des üblichen Doppelstranges eine „Blase“. Sie führt dazu, dass die Wechselwirkungen zwischen Säulenmatrix und Heteroduplex schwächer ausgebildet sind als zwischen Säulenmatrix und Homoduplex. Die Heteroduplexes werden somit eher von der Matrix gelöst, was zur Trennung beider Spezies führt.

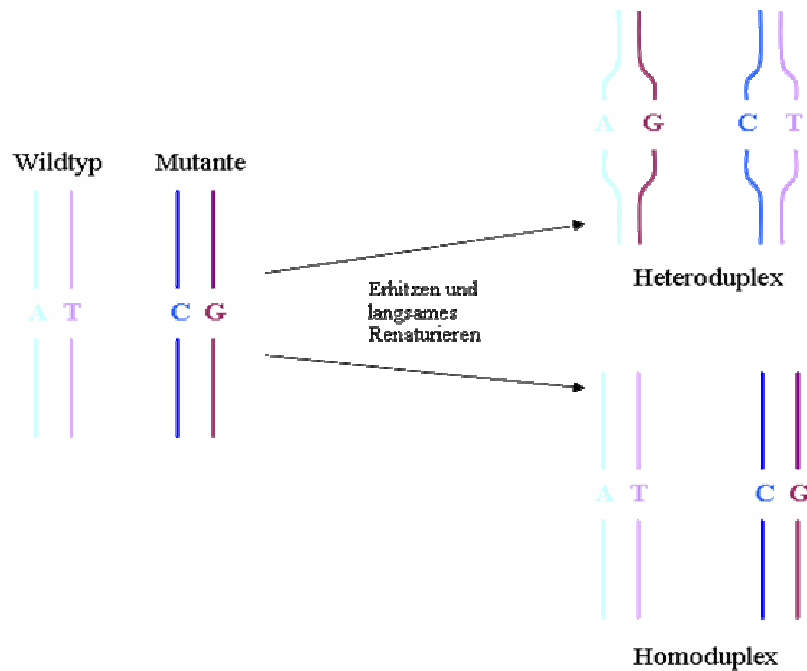


Abb. 2-1: Bildung von Hetero- und Homoduplexen nach Denaturierung und anschließendem Reannealing der Doppelhelix (modifiziert nach Transgenomic; Cheshire, UK).

Nach Abwaschen der DNA-Fragmente misst ein UV-Detektor die Absorption des Eluats bei einer Wellenlänge von 254 nm über den zeitlichen Verlauf. Die Auswertung erfolgt computergestützt in einem Absorptions-Zeit-Chromatogramm (Abb. 2-3). Im Idealfall sollten bei heterozygoten Mutationsträgern im Chromatogramm vier Spitzen (Peaks) zu erkennen sein, zwei Heteroduplex- und zwei Homoduplex-Zacken, da sich beide Formen einer Duplexspezies an einer Basenposition voneinander unterscheiden. Die zuerst eluierten Fragmente entsprechen den Heteroduplexen und die beiden letzten Spitzen den homoduplexen Strängen. Der Unterschied der Retentionszeiten ist aber meist so gering, dass er von der Säule nicht erfasst wird (Xiao und Oefner 2001).

In der Mehrzahl der Fälle zeigt das Chromatogramm bei Heterozygoten zwei Zacken, der erste verursacht durch die thermolabileren Heteroduplexe, der zweite durch die Homoduplexe. Zum Teil ist es auch nur eine zusätzliche Schulter im Homoduplex-Gipfel, die auf die Anwesenheit von Heteroduplexen und damit auf eine Sequenzvariante schließen lässt (Schmitt *et al.*, 2000). DNA-Proben mit homozygoten Mutationen können aufgrund des beschriebenen Funktionsprinzips nicht detektiert werden. Durch Zugabe von amplifizierter Wildtyp-DNA in gleichen Teilen lässt sich die Mutation jedoch darstellen (Huber *et al.*, 1993).

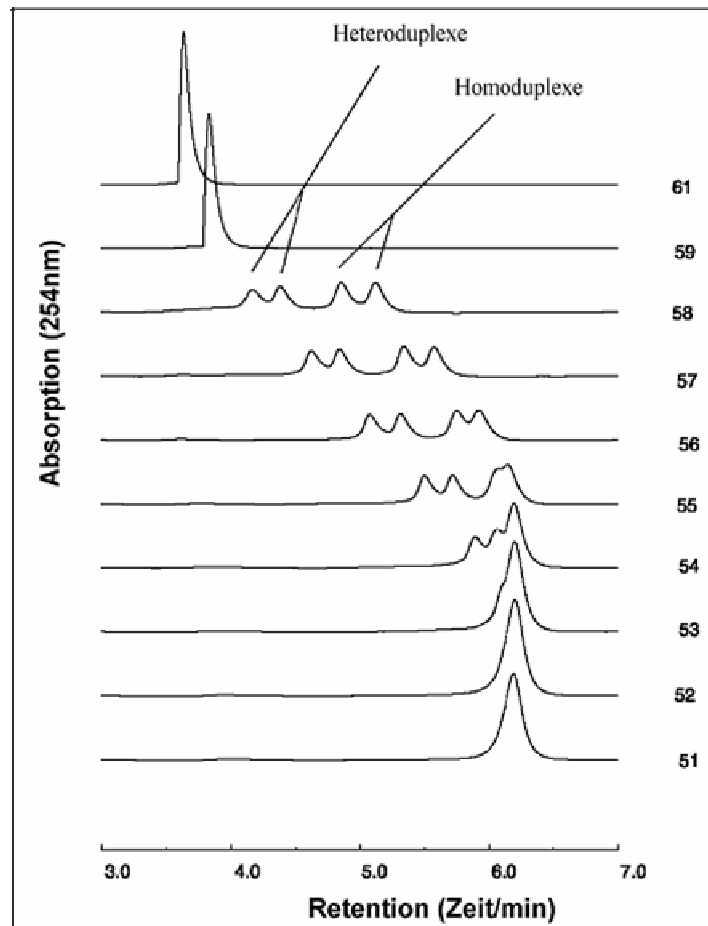


Abb. 2-2: Temperaturabhängige Auflösung von Homoduplexen und Heteroduplexen mit dHPLC. Die Auftrennung von Homoduplexen und Heteroduplexen und damit die Detektion einer Variante sind nur in einem bestimmten Temperaturbereich, der Schmelztemperatur des entsprechenden DNA Fragmentes möglich. Am Beispiel eines Probanden mit einer Mutation auf dem Y-Chromosom wird die Temperaturabhängigkeit deutlich. Bei niedrigen Temperaturen ist kein Unterschied zwischen mutierten und nicht mutierten Allelen ersichtlich. Oberhalb einer Temperatur von 54 °C beginnen die heterozygoten DNA-Fragmente an der Stelle der fehlerhaften Basenpaarung zu denaturieren (modifiziert nach Taylor *et al.*, 1998 und 2000).

Der Faktor mit dem größten Einfluss auf den Erfolg der dHPLC ist die Thermostabilität der Duplex-DNA. Sie wird bedingt durch die Schmelztemperatur, die Temperatur bei der 50 % der DNA als Einzel- und 50 % als Doppelstränge vorliegen. Aufgrund der nicht homologen Basenpaarung haben Heteroduplexe einen geringeren Schmelzpunkt, denaturieren also schon bei niedrigeren Temperaturen als vergleichbare Homoduplexe. Ideale Trennergebnisse liefert die dHPLC bei einer Analysetemperatur, bei der 70-85 % der DNA als Doppelstrang vorliegen (Schmitt *et al.*, 2000).

Das theoretische Schmelzverhalten eines PCR-Produkts kann durch Computerprogramme, auf Grundlage der Sequenz, berechnet werden. Das Schmelzprofil für die DNA-Sequenz jedes Amplikons wurde unter Verwendung der *Wavemaker*-Software, Version 4.0 (Transgenomic; Cheshire,

GB) erstellt. Das Programm ermittelt eine Analysetemperatur und stellt die Schmelzeigenschaften des Fragments graphisch in einem Schmelzdiagramm dar. Dadurch kann man einzelne Schmelzdomänen gut erkennen. Besitzt eine Sequenz mehrere Schmelzdomänen, kann es sinnvoll sein, die Analyse bei verschiedenen Temperaturen durchzuführen.

2.6.2.1 Durchführung der dHPLC

Das WAVE® DNA fragment analysis system wurde für das Mutationsscreening in Exon 7 angewendet. Für die zuvor durchgeführte PCR wurden jeweils nur 1 µl Ausgangs-DNA pro 25 µl Ansatz eingesetzt. Im Anschluss an das PCR-Programm erfolgte eine Denaturierung für fünf Minuten bei 95 °C mit anschließender langsamer Renaturierung über mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur. Für jede verwendete Analysetemperatur wurden je 5 µl des PCR-Amplifikats benötigt. Diese wurden in einem für jedes Fragment spezifisch durch die *Wavemaker*-Software bestimmten Verhältnis aus Puffer A und B (Zusammensetzung siehe 2.1.3.4) gelöst und auf eine vorgeheizte Umkehrphasen-Chromatographiesäule geladen. Durch einen über die Zeit eines Laufes erzeugten linearen Acetonitrilgradienten des Laufpuffers mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,9 ml/min wurden die Fragmente wieder von der Säule eluiert. Der Gradient wurde durch die unterschiedliche Mischung der beiden Puffer A und B erzielt. Puffer C diente als Waschlösung, um nach einem Lauf eventuelle Probenreste von der Säule zu spülen. Puffer D wurde zur Reinigung der Injektionseinheit zwischen jedem Analysevorgang verwendet.

Für das Mutationsscreening in Exon 7 wurden Analysetemperaturen von 61°, 64° und 65°C verwendet. Die Analysebedingungen für Exon 9 und 10 sind in der Dissertation von Frau Jophia Carri (FAAH-Gen: Molekulargenetische Mutationsanalyse bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen) nachzulesen.

2.6.3 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde die von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) entwickelte Kettenabbruchmethode angewandt. Dabei wird die zu sequenzierende DNA, ähnlich wie bei der PCR, zunächst denaturiert, mit einem Oligonukleotid hybridisiert und dieses anschließend mit Hilfe einer Polymerase verlängert. Zusätzlich zu den vier üblichen 2'-Desoxynucleotiden werden in einem bestimmten molaren Verhältnis 2',3'-Didesoxynucleotide eingesetzt. Da diesen am dritten Kohlenstoffatom der Ribose die Hydroxylgruppe fehlt, an die üblicherweise das nächste Nukleotid geknüpft wird, kommt es bei deren Einbau zum Kettenabbruch. So entsteht ein Gemisch aus unterschiedlich langen Fragmenten, die in einem denaturierenden Polyacrylamidgel der Größe nach getrennt werden können.

Bei der heutzutage am häufigsten angewandten automatischen Sequenzierung wird die DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Diese werden während der Elektrophorese mittels Laser angeregt und das emittierte Licht gemessen. In der Regel werden die vier Didesoxynukleotide mit vier verschiedenen Farbstoffen markiert, so dass die Sequenzierreaktion und die Elektrophorese in einem einzigen Ansatz durchgeführt werden können. Das Ergebnis erhält man in einem vierfarbigen Diagramm, in dem jede Farbe für eine Base steht. Durch Vergleich des Basenmusters der vermuteten Sequenzvariante mit dem eines Wildtyps können Veränderungen leicht detektiert werden.

Die Sequenzierung der jeweiligen Exons erfolgte bei allen in der SSCP und der dHPLC wiederholt auffälligen Proben und zum Vergleich bei je einer Wildtyp-Probe. Dafür wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des *QIAquick* PCR Purifikation Kit (Quiagen, Hilden) aufgereinigt und zusammen mit den verwendeten Primern in ein Speziallabor (*Seqlab* Sequence Laboratories GmbH, Göttingen) gesandt. Dort erfolgten für jedes Fragment zwei Sequenzierungen, eine unter Gebrauch des Vorwärts- und eine unter Verwendung des Rückwärts-Oligonukleotids. Durch diese Doppelbestimmung sollten mögliche Sequenzierfehler minimiert werden.

2.7 Genotypisierungsverfahren

2.7.1 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Die Restriktionsfragmentlängen-Analyse ist eine Methode, die es ermöglicht, bei bekannter Mutation oder Polymorphismus, relativ einfach und kostengünstig viele Proben auf das Vorliegen genau dieser Sequenzvariation zu untersuchen. Dafür werden so genannte Restriktionsendonukleasen verwendet, die, je nach Spezifität, vier bis acht Nukleotide erkennen. Die Erkennungssequenzen sind meist so genannte Palindrome, die symmetrisch und damit auf beiden Strängen gleich angeordnet sind. Anschließend schneiden die Enzyme die DNA durch Spaltung von Phosphodiesterbindungen. Die für die RFLP verwendeten Endonukleasen spalten die Polynukleotidkette an genau definierten Stellen, die Schnittstellen müssen aber nicht mit der Erkennungssequenz übereinstimmen. In Bakterien, ihrem ursprünglichen Herkunftsort, dienen Restriktionsenzyme als Schutzmechanismus vor artfremder DNA. Da durch spezifische Methylierungsmuster die eigene DNA vor dem Abbau geschützt ist, werden nur fremde Nukleotidsequenzen erkannt und herausgeschnitten.

Die Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme erfolgte unter Verwendung spezieller Online-Programme (z. B. RestrictionMapper: <http://www.restrictionmapper.org>). Diese erstellen für eine gegebene Sequenz Restriktionskarten mit Schnittstellen bekannter Restriktionsendonukleasen. Anhand dieser Karten konnten Enzyme ausgewählt werden, die die Wildtyp-Sequenz schneiden, nicht aber die Sequenzvariante oder umgekehrt. Folglich muss ein Polymorphismus eine

Erkennungssequenz zerstören oder erzeugen, damit er mit Hilfe eines Restriktionsenzym nachgewiesen werden kann. Des Weiteren müssen die entstehenden Fragmente einen entsprechenden Längenunterschied aufweisen, damit eine eindeutige Zuordnung zu Wildtyp beziehungsweise Variante anhand des Schnittmusters möglich ist.

2.7.1.1 Durchführung

Vorab wurde die zu untersuchende DNA wie oben beschrieben in einem 25 µl PCR-Ansatz amplifiziert. Davon wurden 15 µl für den Restriktionsverdau eingesetzt. Zur Optimierung der idealen Enzymmenge, wurde zunächst DNA bekannter Sequenz mit 1, 2, und 3 Units Enzym verdaut. Die entsprechenden Puffer wurden gemäß den Herstellerangaben zugegeben und mit Aqua bidest. auf 30 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte der Restriktionsverdau bei 37 °C im Wasserbad über zwei Stunden. Die entstandenen Fragmente wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und das Bandenmuster mit bekannter Wildtyp- und Mutanten-DNA verglichen.

Tab. 2-11: *Eingesetzte Restriktionsenzyme und die verschiedenen Fragmentlängen nach dem Restriktionsverdau.*

Fragment	SNP	Enzym	Basen-austausch	PCR-Produkt [bp]	Wildtyp [bp]	Mutation [bp]
Intron 1	IVS1+22G>A	<i>BccI</i>	G > A	495	374 65 55	439 55
Exon 3	rs324420	<i>Eco130I</i>	C > A	300	168 131	300
Exon 15.3b	rs2295632	<i>BccI</i>	T>G	361	361	219 142

2.7.2 Tetra-primer Arms-PCR (Allel-spezifische PCR)

Die ARMS-(amplification refractory mutation system)-PCR ist eine schnelle, einfache und kostengünstige Methode, um den Austausch einzelner Basen nachzuweisen. Dabei verwendet man in einem einzigen Reaktionsansatz vier Oligonukleotide (Ye *et al.*, 2001). Die beiden äußeren Oligonukleotide binden allelunabhängig. Dadurch wird sichergestellt, dass bei Fehlen eines der beiden allelspezifischen ARMS-PCR-Produkte auf die Abwesenheit des dazugehörigen Genotyps geschlossen werden kann. Die beiden inneren Primer lagern sich spezifisch an je ein Allel an, entweder an die Wildtyp-Sequenz oder die Mutation. Dies ist möglich, da Oligonukleotide, die sich am 3'Ende in nur einer Base im Vergleich zu einer gegebenen DNA-Sequenz unterscheiden, nicht an diese binden. Demzufolge wurde das 3'Ende der inneren Oligonukleotide so gewählt, dass es an

der Stelle des Basenaustausches lag und entweder zu der Sequenz des Wildtyps oder der Variante komplementär war. Zur Verstärkung des Effekts wurde an dritter Position vom 3'-Ende noch eine weitere nicht komplementäre Base eingefügt.

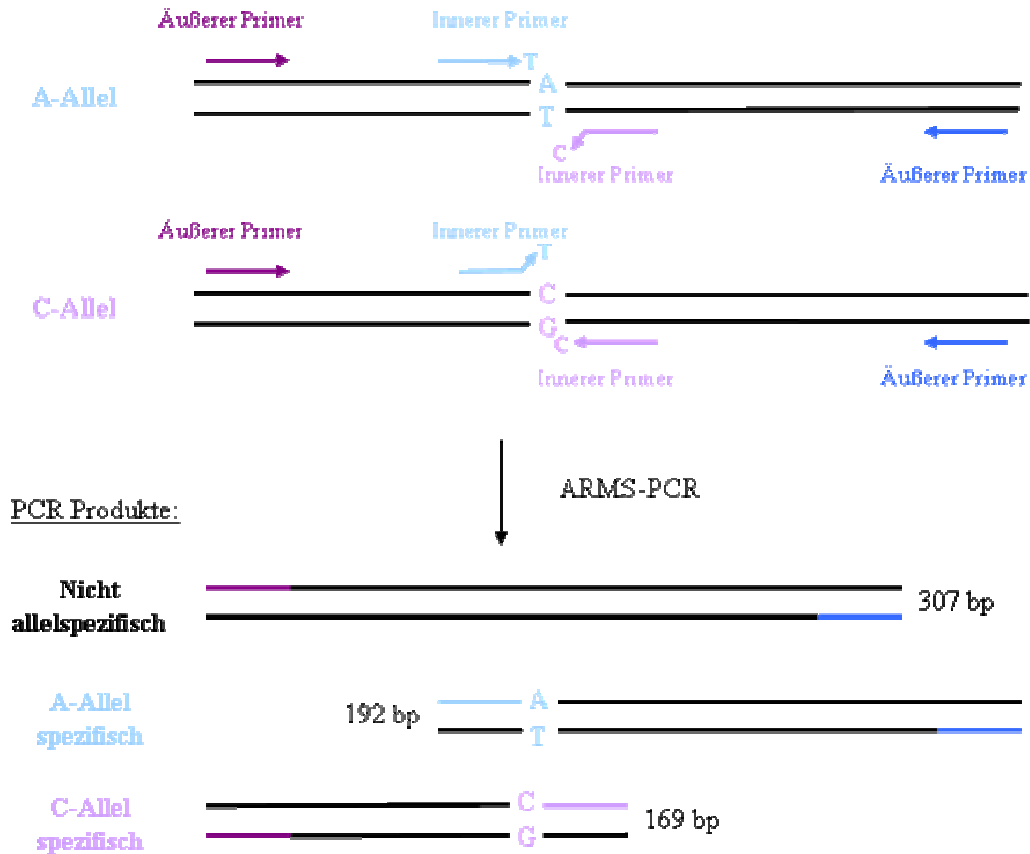


Abb. 2-3: Schematische Darstellung der ARMS-PCR von Exon 15.3b. Der SNP rs2295632 führt zu einem Basenaustausch A > C. Die beiden blauen Oligonukleotide generieren ein Amplifikat, wenn das A-Allel (192 bp) vorkommt und die violetten, wenn das C-Allel (169 bp) vorliegt. Das allelunspezifische PCR-Produkt (307 bp) entsteht unabhängig davon, welches Allel vorhanden ist (modifiziert nach Ye *et al.*, 2001).

Nur bei vorausgegangener Oligonukleotidhybridisierung kann es zur Strangsynthese und damit zur Amplifizierung des entsprechenden allelspezifischen Fragments kommen. Das amplifizierte Fragment kann mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden, so dass ein für jeden Genotyp charakteristisches Bandenmuster entsteht. Die Auswahl der ARMS-Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe des online Programms ARMS Primer Design der Human genetics Division, School of Medicine, University Southampton, UK (http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html).

Zur Etablierung optimaler Bedingungen wurde die ARMS-PCR mit drei verschiedenen Magnesium-Konzentrationen in einem Thermogradienten-Cycler bei 12 unterschiedlichen Annealing-

Temperaturen zwischen 60° und 70 °C durchgeführt. Zusätzlich wurde die Konzentration der äußeren Oligonukleotide in drei weiteren Ansätzen in dem Verhältnis 1:2, 1:5 und 1:10 verdünnt. Obwohl alle diese Einflussfaktoren variiert wurden, war es für Exon 15.3b nicht möglich ein geeignetes Bandenmuster für die Kontroll-DNA mit bekanntem Genotyp zu erzielen. Somit konnte diese Methode nicht zur Genotypisierung weiterer Kollektive verwendet werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse des Mutationsscreens im Screening-Kollektiv dienten die Ergebnissen der Genotypisierung aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe als interne Kontrolle.

Tab. 2-12: *Tabelle der verwendeten ARMS-Oligonukleotide für Exon 15.3b (SNP rs2295632).*

Name	Oligonukleotidsequenz	Schmelztemperatur
rs2295632 iF	5' TTTCTGGGCGTCATCGTGAGGGTGGAGT 3'	76 °C
rs2295632 iR	5' CAGCCCTGCTCTCAACAGGCTCCGAC 3'	75 °C
rs2295632 oF	5' CCCTGCTCTGGTCCCCTCTCTTCGTCCT 3'	75 °C
rs2295632 oR	5' AGTGTAGGGTGAGAGAGGAGGGGCACGGC 3'	75 °C

2.8 Statistische Verfahren

Die statistischen und biometrischen Berechnungen erfolgten durch die Kooperationspartnerin T. Nguyen, Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. H. Schäfer.

2.8.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht geht auf den Mathematiker G. H. Hardy und den Arzt W. Weinberg zurück. Diese stellten 1900 unabhängig voneinander eine Methode zur Berechnung der Allelhäufigkeit in einer Population auf. Dabei muss die Population folgende Voraussetzungen erfüllen:

- ◆ Der betrachtete Organismus ist diploid und pflanzt sich geschlechtlich fort.
- ◆ Die Population muss ausreichend groß sein, so dass Zufallsschwankungen keinen großen Einfluss auf die Allelhäufigkeiten haben.
- ◆ Es herrscht Panmixie, d.h. jedes Individuum hat die gleiche Chance seine genetische Information an die Folgeneration weiterzugeben.
- ◆ Es treten keine Mutationen auf.
- ◆ Der Selektionsdruck ändert sich nicht.
- ◆ Es tritt kein Gendrift, keine Migration und keine Populationsabspaltung auf.

Existieren in einer solchen Idealpopulation für einen Genlocus zwei Allele, A und a, mit den Häufigkeiten $P(A) = p$ und $P(a) = q$, lässt sich die theoretische Verteilung der Genotypen in einer Kreuztabelle darstellen:

	A, $P(A) = p$	a, $P(a) = q$
A, $P(A) = p$	AA	Aa
a, $P(a) = q$	Aa	aa

Abb. 2-4: Kreuztabelle zur Bestimmung der Genotyphäufigkeiten.

Zusammengefasst ergibt sich folgende Verteilung: 1x AA + 2x Aa + 1x aa. Die statistische Wahrscheinlichkeit für das gleichzeitige Auftreten zweier voneinander unabhängiger Ereignisse ist gleich dem Produkt ihrer Einzelwahrscheinlichkeiten. Somit beträgt die Wahrscheinlichkeit für das Zusammentreffens zweier A-Allele $P(AA) = p^2$ und für das gleichzeitige Vorkommen zweier a-Allele $P(aa) = q^2$. Die Häufigkeit, dass ein Allel A mit einem Allel a zusammenkommt ist $P(Aa) = pq + pq = 2pq$. Da die Summe der Einzelwahrscheinlichkeiten stets den Wert eins ergeben muss ergibt sich nachstehende Formel:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \text{ (Hardy-Weinberg-Gleichgewicht)}$$

Das Hardy-Weinberg-Gesetz besagt, dass diese Verteilung in einer idealen Population für die derzeitige Generation ebenso wie für die nachfolgenden gilt. Die Allelhäufigkeiten stehen in einem stabilen Gleichgewicht.

2.8.2 Statistische Tests

Zu Beginn der laborexperimentellen Untersuchungen wurde eine Hypothese über Eigenschaften einer Population aufgestellt. Anschließend wurde überprüft, inwieweit die postulierten Eigenschaften der Population durch stichprobenartig erhobene Daten bestätigt werden konnten. Dafür diente ein statistischer Test, der es erlaubt anhand von empirischen Daten (z.B. Stichprobenergebnissen) über die Richtigkeit einer Hypothese zu entscheiden. Ein solcher Test umfasst folgende Schritte (Sachs, L. 2002; Bortz, J. 2005):

1. Formulierung wissenschaftlicher Hypothesen

Es wurde zunächst eine Alternativ- oder Gegenhypothese (H_1) festgelegt, die eine Annahme über die unbekannte Verteilung einer Zufallsvariablen trifft und eigentlich überprüft werden soll. Zu dieser Aussage komplementär wurde eine Nullhypothese (H_0)

formuliert. Sie besagt, dass der in der Alternativhypothese postulierte Sachverhalt nicht zutrifft.

2. Überführung in statistische Hypothesen

Da explorative Untersuchungen durchgeführt wurden, lagen weder Daten zur Allelverteilung noch zu einem genetischen Modell vor. Somit erfolgte die Formulierung der Gegenhypothese zweiseitig, da die Fehlerrichtung der Häufigkeitsschätzer p_1 und p_2 nicht bekannt war. Die Häufigkeiten p_1 und p_2 stehen für die jeweiligen Anteile der Grundgesamtheiten mit einer bestimmten Ausprägung des Phänotyps. Die statistische Nullhypothese heißt $p_1 = p_2$, die Alternativhypothese $p_1 \neq p_2$ ($p_1 < p_2$ oder $p_1 > p_2$).

3. Wahl der Stichprobe

Es wurden für die zu untersuchenden Phänotypen Stichproben ausgewählt und entschieden, ob einzelne Probanden oder Kernfamilien untersucht werden sollten.

4. Auswahl eines Testverfahrens

Es wurde der Chi-Quadrat Test (χ^2 - Test) mit einem Freiheitsgrad verwendet.

5. Wahl des Signifikanzniveaus und der kritischen Grenze

Der Fehler erster Art (α - Fehler) besteht darin, dass die Nullhypothese verworfen wird, obwohl sie in der Grundgesamtheit zutrifft. Es wurde festgelegt, die Nullhypothese erst dann zu verwerfen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner oder gleich 5 % ist. Diesen Grenz- oder Schwellenwert bezeichnet man als Signifikanzniveau.

Die kritische Grenze des χ^2 -Wertes muss in einer χ^2 - Tabelle herausgesucht werden. Bei einem Freiheitsgrad von eins und einem Flächenanteil von $1 - \alpha = 0,95$ ergibt sich ein theoretischer χ^2 - Wert von 3,84.

6. Durchführung des statistischen Tests und Ableiten einer Entscheidung

Um zu entscheiden, ob die Nullhypothese verworfen werden kann, müssen der χ^2 - und der p-Wert bestimmt werden. Der errechnete χ^2 -Wert gibt an, ob der Unterschied zwischen den zwei beobachteten relativen Häufigkeiten mit der Nullhypothese vereinbar ist oder nicht. Ist der empirische χ^2 - Wert größer als der theoretische χ^2 - Wert, wird die Nullhypothese verworfen.

Der zugehörige p-Wert konnte aus entsprechenden veröffentlichten Tabellen entnommen werden. Er entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit beim Verwerfen der Nullhypothese.

2.8.2.1 Chi-Quadrat (χ^2)-Test

χ^2 - Methoden dienen der Analyse von Häufigkeitsunterschieden im Auftreten bestimmter Merkmale bzw. Merkmalskombinationen. Sie vergleichen beobachtete und erwartete Häufigkeiten. Da-

bei repräsentieren die erwarteten Häufigkeiten die jeweils geprüfte Nullhypothese. Für die durchgeführten Untersuchungen eignete sich der Vierfelder- χ^2 -Test, da nicht verwandten Mitgliedern einer Population zwei Merkmale mit zwei alternativen Merkmalsausprägungen zugeordnet wurden. Der Vierfelder- χ^2 -Test prüft die Unabhängigkeit zweier Merkmale, ohne dass eine Modellannahme des Erbganges gemacht werden muss. Geprüft wurden die Hypothesen:

H_0 = Die Verteilung der Allele ist unabhängig von dem Phänotyp, die Allelhäufigkeiten sind bei beiden Phänotypen gleich.

H_1 = Die Verteilung der Allele ist abhängig vom Phänotyp (Assoziation).

Die festgestellten Häufigkeiten wurden in eine Vierfeldertafel eingetragen:

Tab. 2-13: Vierfeldertafel mit den Allelhäufigkeiten zur Berechnung des χ^2 -Wertes.

		Merkmal 1			
Merkmal 2		Allel 1	Allel 2	Summe	Erwartungswert
	Fälle	a	b	a + b	$p_1 = a / (a + b)$
	Kontrollen	c	d	c + d	$p_2 = c / (c + d)$
	Summe	a + c	b + d		

Für den Test auf Assoziation der Allele wurde der χ^2 -Test nach Pearson verwendet. Ist der empirische χ^2 -Wert größer als der theoretische, ist die Verteilung der Allelhäufigkeiten nicht zufällig, sondern es liegt eine Assoziation vor. Von Assoziation spricht man, wenn ein merkmalsverursachendes Allel eines genetischen Markers signifikant häufiger in der Gruppe der Merkmalsträger als in der Gruppe der Kontrollen auftritt (Lander und Schork 1994).

$$\chi^2 - \text{Test nach Pearson: } \chi^2 = \frac{n (ad - bc)^2}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)}$$

2.8.2.2 Der exakte Test nach Fisher

Der exakte Test nach Fisher ist ebenso wie der χ^2 -Test ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit in einer Kontingenztafel. Er wurde zur Berechnung herangezogen, wenn die Erwartungshäufigkeiten unter 0,05 und/oder die Gesamtzahl der Stichproben unter $n = 20$ lag, da er auch bei wenigen Beobachtungen sein Niveau hält. Hierbei geht man vom Feld mit der geringsten Häufigkeit aus und stellt unter Konstanz der Randsummen alle Vierfeldertafeln auf, die im betreffenden Feld noch

schwächer besetzt sind. In der Gesamtheit aller dieser Vierfeldertafeln haben diejenigen mit der beobachteten oder mit einer noch geringeren Besetzung des am schwächsten besetzten Feldes die Wahrscheinlichkeit p als eine Summe von Gliedern der hypergeometrischen Verteilung:

$$p = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{n!} \sum_i \frac{1}{a_i!b_i!c_i!d_i!}$$

Der Index i bedeutet, dass für jede der aufgestellten Tafeln der hinter dem Summenzeichen stehende Ausdruck zu berechnen und dann in der Summe zusammenzufassen ist. Die Wahrscheinlichkeiten können direkt aus Signifikanztafeln abgelesen werden (Sachs, L. 2002).

2.8.2.3 Bonferroni Korrektur für multiples Testen

Im Rahmen von Assoziationsstudien besteht die Möglichkeit, mehrere Tests durchzuführen. Dabei weist jeder dieser Tests ein eigenes Risiko für ein falsch positives Ergebnis auf. Demzufolge ist für ein aussagekräftiges Ergebnis eine Korrektur notwendig, wenn ein Genlocus auf verschiedene Fragestellungen hin überprüft wird (Shaffer 1995). Ein solches Verfahren ist die Bonferroni-Korrektur für multiples Testen. Dabei ist das Signifikanzniveau abhängig von der Zahl n der möglichen unabhängigen Assoziationen, die geprüft werden. Es wird nicht wie üblich bei $p = 0,05$ festgelegt sondern bei $p = 0,05 / n$.

Der korrigierte p -Wert berechnet sich nach folgender Formel: $p = \alpha / n$

Die in der vorliegenden Arbeit errechneten p -Werte sind nominale Werte, die nicht nach Bonferroni korrigiert wurden und daher nur explorativen Charakter haben.

2.8.2.4 Transmissions-Ungleichgewichts-Test (TDT)

Der Transmissions-Ungleichgewichts-Test (TDT, Transmission-disequilibrium-test) ist ein Assoziationstest, basierend auf Familienstudien. Er vergleicht die Transmissionshäufigkeit eines Allels, das vermutlich mit einem Merkmal assoziiert ist, mit der des alternierenden Allels. Untersucht werden Kinder, die das Merkmal tragen, und ihre heterozygoten Eltern. Dabei nutzt der Test sowohl die Assoziationsinformation der elterlichen Allele, die nicht an das erkrankte Kind weitervererbt werden, als auch die Kopplungsinformation bei der Segregation der elterlichen Allele in der Meiose. Es werden somit gleichzeitig die Assoziation und Kopplung eines Merkmals überprüft (Spielman *et al.*, 1993). Wenn größere Familien zur Verfügung stehen, ist es natürlich

wünschenswert, auch diese in die Untersuchung mit einbeziehen zu können. Dazu eignet sich – auf der Grundlage des TDT – der einseitige, asymptotische PDT (pedigree-disequilibrium-test) (Martin *et al.*, 2000). Auch mit dem PDT können Kopplung und Assoziation gleichzeitig untersucht werden.

Die Häufigkeiten der transmittierten und nicht-transmittierten elterlichen Allele werden in eine Vierfeldertafel eingetragen. Liegt eine Kopplung des Markerallels mit dem Krankheitsallel vor, sollte das Markerallel überzufällig häufig zusammen mit dem Krankheitsallel an ein erkranktes Kind weitervererbt werden. Folglich sollte die Vererbung des Markerallels von der 50 %-Verteilung nach den Mendelschen Regeln abweichen.

		Transmittiert	
		Allel 1	Allel 2
Nicht-Transmittiert	Allel 1	a	b
	Allel 2	c	d

Abb. 2-5: Vierfeldertafel zur Bestimmung der Häufigkeiten des transmittierten und nicht-transmittierten Allels.

Aus der Vierfeldertafel lassen sich die Häufigkeiten der Transmission des Markerallels und der Transmission des alternierenden Allels, also der Nichttransmission des Markerallels ablesen. Diese werden in folgender Formel miteinander in Beziehung gesetzt:

$$\chi^2 = \frac{(b - c)^2}{(b + c)}$$

Unter den Bedingungen von Unabhängigkeit sind die Testwerte entsprechend einer χ^2 -Verteilung mit einem Freiheitsgrad verteilt. Bestehen sowohl Kopplung als auch Assoziation zwischen Marker- und Krankheitsallel, sind b und c verschieden groß. Weicht das Testergebnis statistisch signifikant (üblicherweise p - Werte < 0,05) von der χ^2 -Verteilung ab, wurde ein Einfluss des Polymorphismus auf den Phänotyp angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Strukturelle Untersuchung des Kandidatengens

Fettsäureamidhydrolase

Das Endocannabinoidsystem stellt einen wichtigen Regelkreis dar, der wie unter 1.7 ausführlich beschrieben, einen entscheidenden Einfluss auf die Nahrungsaufnahme und die Energiehomöostase hat. Damit ist das Gen der Fettsäureamidhydrolase, das den Abbau der Endocannabinoide katalysiert, ein plausibles Kandidatengen für die Gewichtsregulation. Zu Beginn der genetischen Untersuchungen erfolgte eine Aufklärung der Struktur des betreffenden Gens mit Hilfe genomischer Datenbanken. Hierfür wurden vor allem folgende Datenbanken verwendet: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) und ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>).

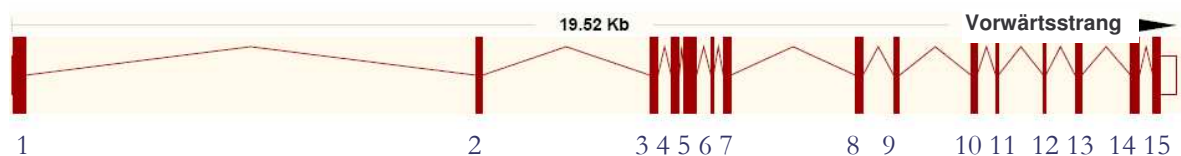


Abb. 3-1: Schematische Darstellung des Gens *FAAH*: 19,58 kb Länge, die Kästen symbolisieren die Exons, dazwischen liegen die intronischen Bereiche (ENST00000117480).

FAAH wurde beim Menschen auf Chromosom 1q34-35 lokalisiert und besteht aus 15 Exons. Das Gen hat eine Transkriptionslänge von insgesamt 19,58 kb. Der kodierende Bereich umfasst 1.737 bp mit einer Translationslänge von 579 AS. Rechnet man den 5' (29 bp) und den 3' untranslatierten Bereich (265 bp) hinzu, ergibt sich eine Gesamtgröße aller Exons von 2.031 bp.

3.2 Genotypisierung von vier Polymorphismen im *FAAH*-Gen

Im GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit erfolgte initial die Genotypisierung vier verschiedener Polymorphismen des *FAAH*-Gens in 356 adipösen Kindern (mittlerer BMI $31,86 \pm 5,99$ kg/m², entsprechend der 98,98. Perzentile; mittleres Alter $13,42 \pm 3,09$ Jahre) und ihren beiden leiblichen Eltern (mittlerer BMI $30,0 \pm 6,38$ kg/m²; mittleres Alter $42,32 \pm 6,07$ Jahre). Dies wurde mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry) durchgeführt, einem Verfahren, das beruhend auf der ungleichen Masse der vier Nukleotide DNA-Stränge auftrennt. Weisen die DNA-Fragmente nicht identische Nukleotidsequenzen auf, lassen sie sich anhand differenter Geschwindigkeiten unter-

scheiden. Die Ergebnisse der Genotypisierung des oben beschriebenen Kollektivs sind in Tabelle 3-1 (unter „Trios“, Spalte 4) dargestellt.

Tab. 3-1: Ergebnisse der Genotypisierung vier verschiedener SNPs innerhalb des FAAH-Gens. P-Werte der Typisierung in Trios (356 Indexpatienten), Quartetten (235 Indexpatienten) und der Kombination aus Trios und Quartetten.

SNP	Basenaustausch Allelfrequenz	häufiger trans- mittiertes Allel	Trios (TDT) p-Wert	Quartette (PDT) p-Wert	Kombination (PDT) p-Wert
rs324420 (Exon 3)	C>A 0,802/0,198	C	0,06	0,14	0,02
rs324419 (Exon 7)	C>T 0,838/0,162	T	0,08	0,75	0,18
rs873978 (Intron 7)	C>T 0,99/0,01	C	0,09	0,56	0,08
rs2295632 (3'Bereich)	G>T 0,732/0,268	G	0,05	0,32	0,03

Insgesamt zeigen alle vier untersuchten Polymorphismen in der Trio-Studiengruppe dieselbe positive Tendenz, die eine Assoziation mit Adipositas vermuten lässt. Deshalb wurde an diese Untersuchung ein Mutationsscreen des FAAH-Gens angeschlossen, um weitere, bislang eventuell noch unbekannte genomische Veränderungen des FAAH-Gens aufzudecken. Der SNP rs2295632 im 3'Bereich wies in der Trio-Studiengruppe den niedrigsten p-Wert von 0,05 auf (Tabelle 3-1), so dass er bei der Erstellung des Screening-Kollektivs Berücksichtigung fand (siehe Kapitel 2.2). Es wurden hierfür diejenigen Indexpatienten, also adipösen Kinder, ausgesucht, die am stärksten zu dem beobachteten Transmissionsungleichgewicht beigetragen hatten.

Ein signifikanter p-Wert (definiert als $p < 0,05$) lag für keinen der untersuchten Polymorphismen in der Triostudiengruppe vor. Zur Verifizierung der initialen Ergebnisse wurden im weiteren Verlauf die vier oben genannten SNPs zusätzlich in 235 Quartetten bestehend aus 501 (davon 229 männlichen) adipösen Kindern (je ein Indexpatient und mindestens ein adipöses Geschwisterkind) sowie ihren Eltern genotypisiert. Die Indexpatienten hatten einen mittleren BMI von $32,28 \pm 5,91 \text{ kg/m}^2$ (entsprechend einer BMI-Perzentile von $99,25 \pm 1,48$) und ein mittleres Alter von $13,40 \pm 2,63$ Jahren. Die Geschwisterkinder hatten einen mittleren BMI von $28,57 \pm 5,29 \text{ kg/m}^2$ (entsprechend

einer BMI-Perzentile von $97,37 \pm 2,85$) sowie ein mittleres Alter von $15,15 \pm 5,09$ Jahren und die Eltern einen mittleren BMI von $31,07 \pm 6,03 \text{ kg/m}^2$ sowie ein mittleres Alter von $43,06 \pm 5,81$ Jahren. Unter Einbeziehung sowohl der Trios als auch der Quartette wiesen rs324420 und rs2295632 ähnlich niedrige nominale p-Werte von 0,02 bzw. 0,03 auf. Nach Korrektur für multiples Testen waren beide Ergebnisse nicht signifikant. Der bereits von Sipe *et al.* untersuchte Polymorphismus rs324420 (Pro129Thr) in Exon 3 zeigte in diesen beiden Studiengruppen eine genau diametrale Tendenz verglichen mit Sipes Beobachtungen. Häufiger transmittiert wurde in dem hier untersuchten Kollektiv das C-Allel, also die Prolin-Variante und damit das Wildtypallel. Gleiches gilt für rs324419 in Exon 7. Hier wurde mit dem C-Allel ebenfalls das Wildtypallel häufiger, aber nicht signifikant, transmittiert. Die anderen beiden, in nicht kodierenden Regionen gelegenen Polymorphismen zeigten jeweils eine seltenere Transmission des Wildtypallels (Muller *et al.*, 2010)

3.3 Mutationsscreening des *FAAH*-Gens

In einem Kollektiv aus 92 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen wurde der kodierende Bereich des *FAAH*-Gens inklusive 163 bp in 5'-Richtung vor dem Startcodon und 413 Nukleotiden in 3'-Richtung nach dem Stopcodon gescreent. Dafür erfolgte eine Aufteilung der kodierenden Sequenz in 17 Fragmente mit Größen zwischen 179 und 495 bp, so dass insgesamt, inklusive der flankierenden intronischen Bereiche, ein 4.410 bp umfassender Bereich untersucht wurde. Das Mutationsscreening des *FAAH*-Gens und die anschließende Genotypisierung gefundener Polymorphismen erfolgten in Kooperation mit Frau Jophia Carri, die in ihrer Dissertation (*FAAH*-Gen: Molekulargenetische Mutationsanalyse bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen) ausführlich auf die Ergebnisse des Mutationsscreens der Exons 2, 5, 6, 9, 10, 13 und 14 in der untersuchten Patientengruppe eingeht. Ein kurzer Überblick über den Inhalt der Arbeit von Frau Carri wird in Kapitel 3.6 gegeben.

Die Ergebnisse des Mutationsscreens der übrigen Exons sollen im Folgenden näher erläutert werden. Für die Exons 1, 3, 4, 8, 11, 12 und 15 kam die Methode der Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP), für Exon 7 das Verfahren der dHPLC zur Anwendung. Um die genaue Position und die Art der Veränderung zu bestimmen, erfolgte die Sequenzierung je einer der Proben mit auffälligem SSCP- bzw. dHPLC-Muster. Unter Verwendung einer alternativen Methode wurden neu gefundene Varianten anschließend noch einmal bestätigt. Bei dem Mutationsscreen der oben genannten Exons des Gens für die Fettsäureamidhydrolase in dem Screening-Kollektiv aus 92 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen (Untergruppe der Trio-Studiengruppe) konnten fünf verschiedene Polymorphismen detektiert werden (s. Tabelle 3-2). Darunter befanden sich die drei bereits bekannten SNPs rs324420 in Exon 3, rs324419 in Exon 7 und rs2295632 im 3'-Bereich. Des

Weiteren konnten zwei neue Varianten in flankierenden intronischen Bereichen detektiert werden. Es sei darauf hingewiesen, dass die beobachteten Allel- und Genotyphäufigkeiten nicht dem Hardy-Weinberg Gleichgewicht unterliegen, da es sich bei dem Screening-Kollektiv um ein speziell zusammengesetztes Kollektiv handelt (siehe Kapitel 2.2).

Tab. 3-2: Tabelle detektierter SNPs und Varianten im *FAAH*-Gen in den Exons 1, 3, 4, 7, 8, 11, 12 und 15 sowie den flankierenden intronischen Bereichen .

<u>Lokalisation</u>	<u>SNP</u>	<u>absolute Häufigkeiten</u>	<u>relative Häufigkeiten</u>	<u>Allelfrequenz</u>	<u>Screening-methode</u>
Intron 1	IVS1+22G>A	31 x GG 49 x AG, 12 x AA	34 % GG 53 % AG 13 % AA	G/A = 0,6/0,4	SSCP
Exon 3	rs324420 (c385C>A) (Pro129Thr)	83 x CC 9 x AC	81 % CC 9 % AC	C/A = 0,95/0,05	SSCP
Intron 6	IVS6-41G>A (rs41309147)	77 x GG 15 x AG	84 % GG 16 % AG	G/A = 0,92/0,08	dHPLC
Exon 7	rs324419 (c897C>T) (Cys299Cys)	70 x CC 22 x CT	76 % CC 24 % CT	C/T = 0,88/0,12	dHPLC
3' Bereich	rs2295632 (*315T>G)	18 x GG, 74 x GT	20 % GG 80 % GT	G/T = 0,6/0,4	SSCP

3.3.1 Bestätigung bereits genotypisierter SNPs

Wie vorangehend erwähnt, wurden im Screening-Kollektiv drei Polymorphismen detektiert, die bereits in der oben beschriebenen Genotypisierung untersucht worden waren. In dem vorliegenden Kollektiv konnte zum einen den SNP rs324420 nachgewiesen werden, der zu einem Austausch der Base Cytosin gegen Adenin führt und damit einen Transfer der Aminosäure Prolin zu Threonin zur Folge hat. Es wurden 9 heterozygote Probanden für den in Exon 3 lokalisierten SNP identifiziert. Da dies mit den Ergebnissen der Genotypisierung übereinstimmte, wurde der Polymorphismus im Anschluss an die Sequenzierung nicht mit einer weiteren Methode bestätigt. Die Genotypisierung in Trios und Quartetten hatte initial eine nominale Evidenz für eine Assoziation mit frühmanifeste Adipositas gezeigt. Deshalb wurde der SNP zusätzlich in einem Kollektiv aus extrem adipösen Probanden sowie normal- und untergewichtigen Kontrollen auf eine Assoziation mit Adipositas im Erwachsenenalter hin analysiert (siehe Kapitel 3.5).

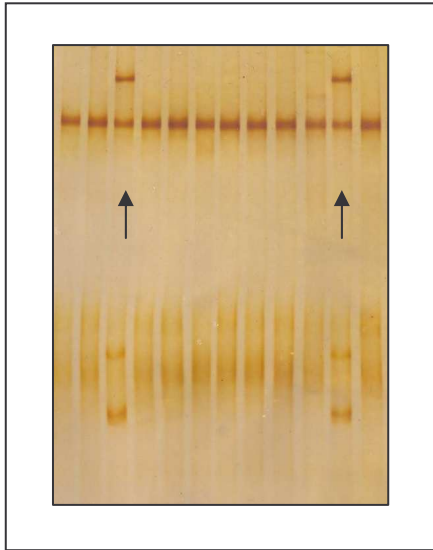


Abb. 3-2: SSCP-Gel (Silberfärbung) des *FAAH* SNPs rs324420 bei 4°C: Die Pfeile zeigen auf 2 Heterozygote Probanden (AC), alle anderen sind homozygot für das C-Allel.

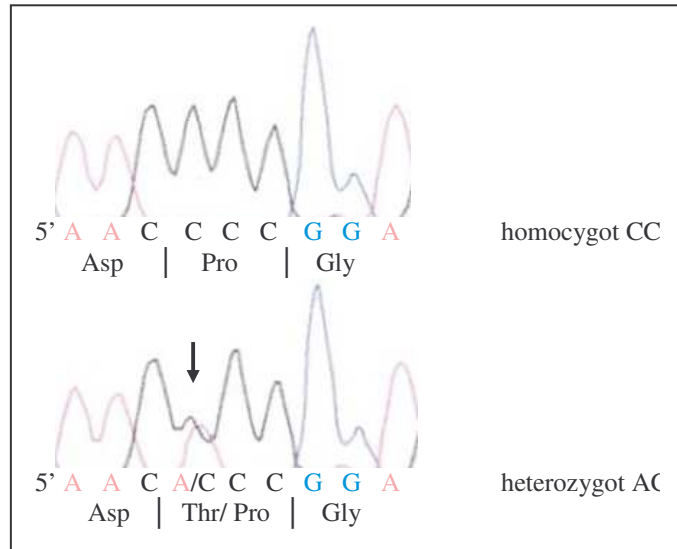


Abb. 3-3: Sequenzanalyse des *FAAH* SNPs rs324420 C>A (Pro129Thr) im Exon 3 des Gens: Oben ist die Wildtypsequenz, unten die Sequenz eines heterozygoten Patienten dargestellt.

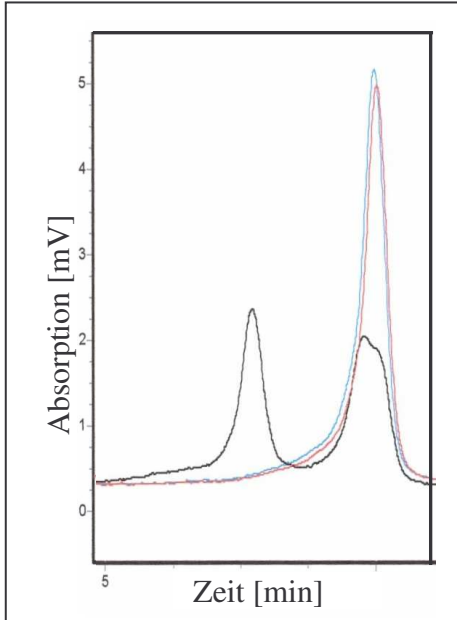


Abb. 3-4: dHPLC Typisierung des *FAAH* SNPs rs324419: Die blaue und rote Kurve entsprechen homozygoten (CC), die schwarze Kurve einem heterozygoten (CT) Probanden.

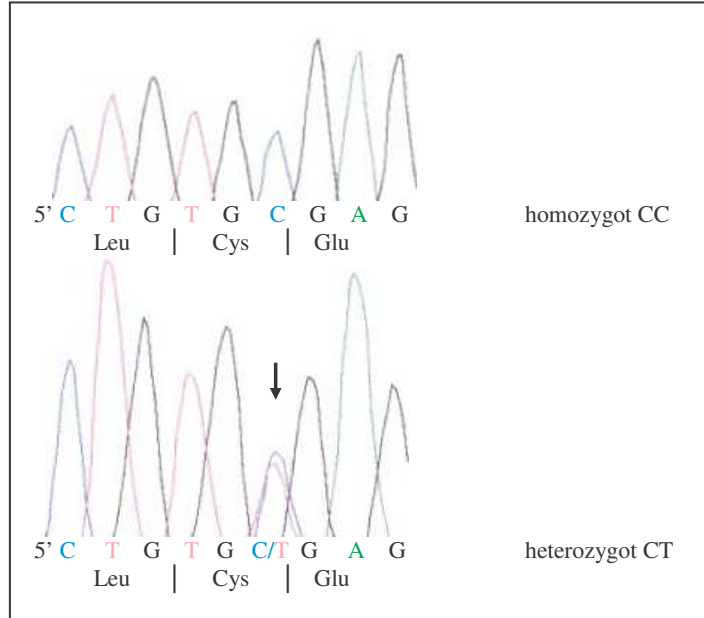


Abb. 3-5: Sequenzanalyse des *FAAH* SNPs rs324419 T>C (Cys>Cys) im Exon 7: Oben ist die Wildtyp-DNA, unten die Sequenz eines heterozygoten Probanden dargestellt.

In Exon 7 konnten 22 heterozygote Probanden für den SNP rs324419 detektiert werden. Dieser Ersatz von Thymin durch Cytosin hat keinen Aminosäureaustausch zur Folge und ist somit stumm. Da auch in diesem Fall die Ergebnisse mit denen der Genotypisierung konform waren, diente dies als interne Kontrolle. Mit Ausnahme der Sequenzierung wurde kein weiteres Verfahren zur Verifizierung angewendet. Dieser Polymorphismus zeigte in der initialen Genotypisierung in Trios und Quartetten einen p-Wert von 0,18. Eine Assoziation einer der beiden Varianten mit Adipositas ist damit sehr unwahrscheinlich und der SNP wurde nicht in einem weiteren Kollektiv untersucht.

Der für die Auswahl des Screening-Kollektivs maßgeblich verantwortliche Polymorphismus im 3'-Bereich (rs2295632) konnte mithilfe der SSCP bestätigt werden. Im Screening-Kollektiv konnten 16 heterozygote Träger und 76 Homozygote für das G-Allel detektiert werden. Diese Daten stimmten ebenfalls mit den Vorbefunden der Arbeitsgruppe überein, so dass dies neben der Sequenzierung als ausreichende Kontrolle angesehen wurde. Dieser Basenaustausch liegt außerhalb des Translationsbereichs, so dass er keinen Aminosäureaustausch zur Folge hat.

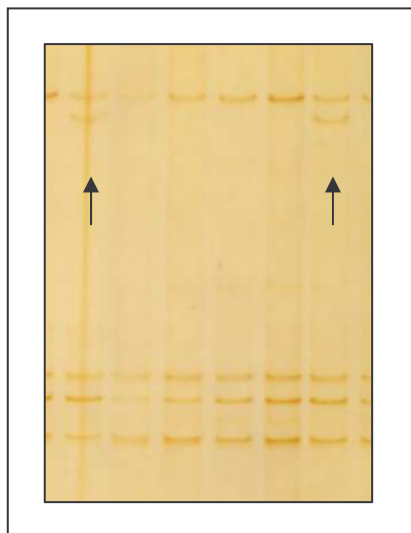


Abb. 3-7: SSCP-Gel (Silberfärbung) bei RT mit der Variante rs2295632 des *FAAH*-Gens: Die Pfeile zeigen auf 2 heterozygote Probanden (GT), alle anderen sind homozygot für das G-Allel.

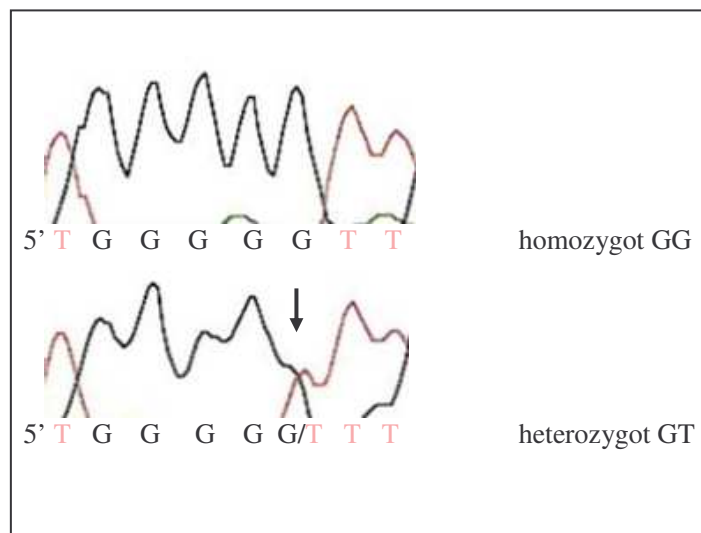


Abb. 3-6: Sequenzanalyse des *FAAH* SNPs rs2295632 T>G im 3'-Bereich des Gens: Oben ist die Sequenz eines heterozygoten Patienten, unten die Wildtypsequenz dargestellt.

3.3.2 Identifizierung von zwei neuen Polymorphismen

In dem gescreenten Kollektiv konnten zwei bislang noch nicht bekannte Varianten detektiert werden. Im ersten Intron konnte ein Austausch von Guanin zu Adenin (IVS1+22G>A) identifiziert. Von den untersuchten Probanden erwiesen sich 49 als heterozygote Träger und 12 homozygot für

das A-Allel. Zur Spezifizierung des neu gefundenen Polymorphismus erfolgte, ebenso wie bei den bereits genotypisierten SNPs, eine Sequenzierung je einer Probe mit auffälligem SSCP-Muster. Anschließend wurde der neue SNP mit einer alternativen Methode noch einmal bestätigt. Da mit Hilfe von Online-Programmen (siehe Kapitel 2.7.1) eine passende Restriktionsendonuklease gefunden werden konnte, wurde die neu entdeckte Variante in Intron eins unter Verwendung einer Restriktionslängenfragment-Analyse (RFLP-PCR) (s. Kapitel 2.7.1) bestätigt. Dieses Verfahren eignete sich für IVS1+22G>A auch zur Verifizierung und Genotypisierung in größeren Studiengruppen (siehe unten).

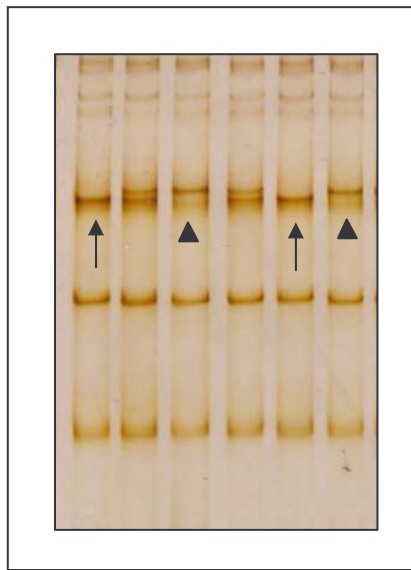


Abb. 3-8: SSCP-Gel (Silberfärbung) bei RT mit der Variante IVS1+22G>A des *FAAH*-Gens. Spur 8 und 12 (s. Pfeile): homozygot (AA), Spur 10 und 13 (s. Pfeilspitze): homozygot (CC), Spur 9 und 11: heterozygot (AC).

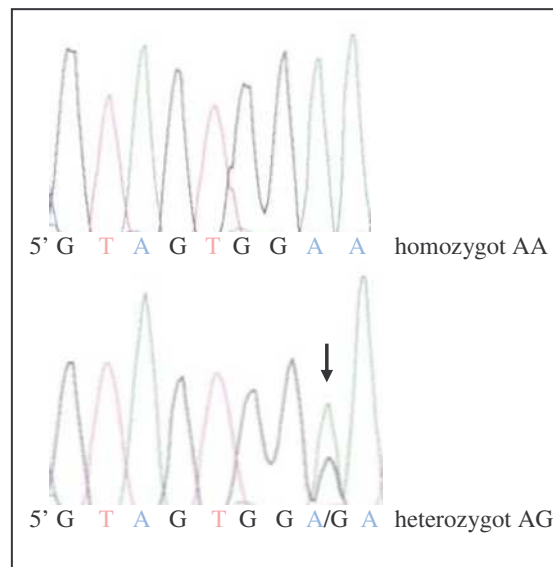


Abb. 3-9: Sequenzanalyse des *FAAH* SNPs IVS1+22G>A im Intron 1 des Gens. Oben ist die Wildtypsequenz, unten die Sequenz eines heterozygoten Patienten dargestellt.

Einen weiteren, ebenfalls bislang unbekannten SNP, konnte im sechsten Intron gefunden werden. Hier ist die Base Guanin durch Adenin ersetzt (IVS6-41G>A). Inzwischen liegt für diese damals noch nicht beschriebene Variante eine rs-Nummer vor: rs41309147. Insgesamt 15 Probanden waren heterozygot für die IVS6-41G>A-Variante. Alle Träger des Polymorphismus rs41309147 in Intron 6 waren ebenfalls heterozygot für den SNP rs324419 in Exon 7. Vermutlich liegt hier ein Kopplungsungleichgewicht vor und die beiden SNPs bilden einen Haplotyp. Der in Vorarbeiten genotypisierte SNP in Exon 7 zeigte dort, wie oben bereits erwähnt, in der Zusammenrechnung aus Trios und Quartetten einen nominalen p-Wert von 0,18. Da dieses Ergebnis eindeutig nicht

signifikant ist und scheinbar keine Assoziation mit Adipositas vorliegt, wurden die beiden Polymorphismen nicht weiter untersucht.

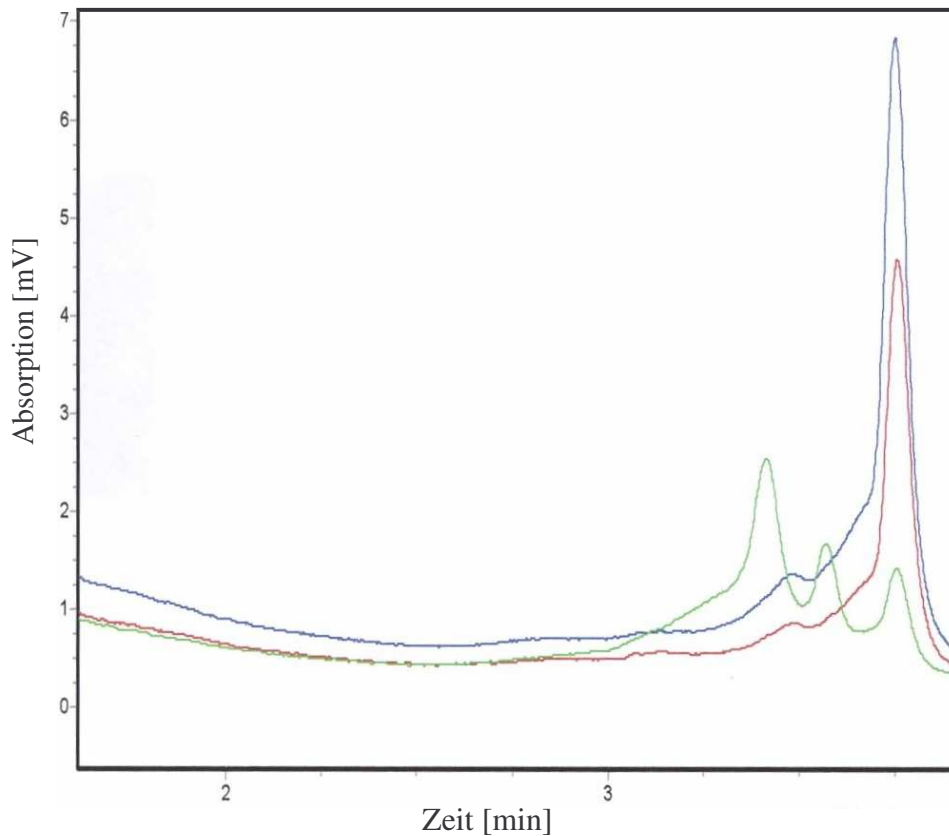


Abb. 3-10: dHPLC Typisierung der *FAAH* SNPs rs41309147 und rs324419. Die grüne Kurve zeigt drei Extrema (vergleiche schwarze Kurve aus Abbildung 3-5: nur zwei Extrema bei für rs324419 heterozygotem Probanden) und stammt von einem Probanden, der sowohl für SNP rs324419 (CT) als auch für rs41309147 (AG) heterozygot ist. Blaue und rote Kurve: homozygot sowohl für rs324419 (CC) als auch für rs41309147 (GG).

3.4 Transmissions-Ungleichgewichts-Test (TDT) für IVS1+22G>A

Der in Intron 1 von *FAAH* detektierte Polymorphismus IVS1+22G>A führt, wie bereits oben beschrieben, zu einem Austausch des Nukleotids Guanin zu Adenin. Dieser Polymorphismus zeigte ein stets wiederkehrendes variierendes Bandenmuster auf den SSCP-Gelen (s. Abb. 3.7), wurde mittels Sequenzierung als SNP IVS1+22G>A identifiziert (s. Abb. 3.8) und über eine spezifische RFLP-PCR im Screening-Kollektiv verifiziert. Anschließend erfolgte unter Verwendung desselben Verfahrens eine Genotypisierung des Polymorphismus in 259 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie ihren Eltern (Studiengruppe s. Tab. 2-5 unter Trios). Mithilfe der Ergebnisse ließ sich ein Transmissionsungleichgewichtstest (TDT) durchführen. Dieser ergab eine bevorzugte Transmission des A-Allels (Transmissionsrate 57,08 %; nominaler p-Wert 0,03).

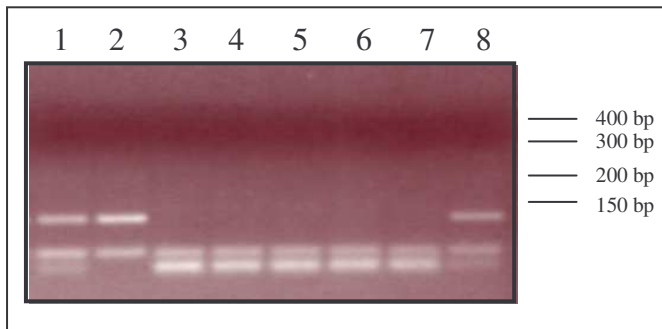


Abb. 3-11: RFLP-PCR Typisierung des *FAAH* SNPs IVS1+22G>A. Das Enzym *BccI* schneidet das G-Allel des SNPs IVS1+22G>A im Intron eins der *FAAH*. Spur 1 und 8: heterozygot (AG), Spur 2: homozygot (AA), Spur 3 bis 7: homozygot (GG).

Tab. 3-3: Ergebnisse der Genotypisierung und des Transmissionsungleichgewichtstests (TDT) des SNP IVS1+22G>A in Intron 1.

<u>Häufigkeiten</u>		<u>Kinder</u>	<u>Eltern</u>
Anzahl Genotypen		259	519
Genotypenhäufigkeiten absolut (relativ [%])	GG	112 (43,24)	244 (47,01)
	AG	120 (46,33)	234 (45,09)
	AA	27 (0,4)	41 (7,9)
Allelhäufigkeiten	Wildtyp (G)	344	722
	Mutation (A)	174	316
Allelfrequenz (G/A)		0,66/0,34	0,70/0,30
<u>TDT</u>			
häufiger transmittiertes Allel		A-Allel	
transmittiert / nicht transmittiert		129 / 97	
Transmissionsrate [%]		57,08	
Chi-Quadrat (χ^2)		4,53	
p-Wert (nominal)		0,03	

3.5 Assoziationsstudie für den *FAAH*-SNP rs324420

In der initialen Genotypisierung von Trios und Quartetten zeigte der Polymorphismus rs324420 den niedrigsten nominalen p-Wert von 0,02. Basierend auf diesem Ergebnis wurde der SNP in einem weiteren unabhängigen Kollektiv bestehend aus 985 adipösen Erwachsenen mit einem BMI > 30 kg/m² und 588 normal- und untergewichtigen Kontrollen (s. Tab. 2-5) genotypisiert. Da durch den Basenaustausch die Schnittstelle einer Restriktionsendonuklease entsteht, fand hierfür das Verfahren der RFLP-PCR Verwendung. Für die bestimmten Allel- und Genotypfrequenzen ist das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erfüllt. Ein Vergleich der Frequenzen in den Studiengruppen zwischen Adipösen und Kontrollen zeigt keine Assoziation sowohl auf Allel- als auch auf Genotypenebene (nominale p-Werte siehe Tabelle 3-4).

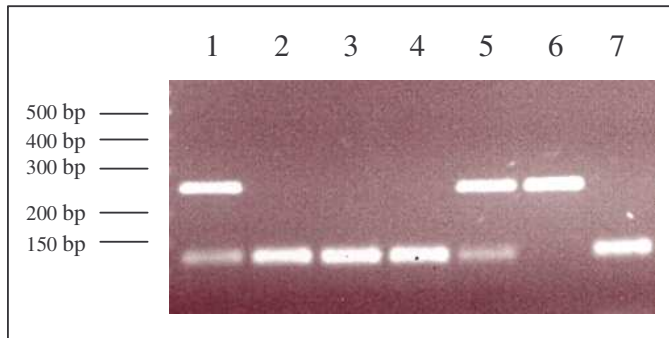


Abb. 3-12: RFLP-PCR Typisierung des *FAAH* SNPs rs324420.

Das Enzym *Eco130I* schneidet das A-Allel des SNPs rs324420 im Exon drei der *FAAH*. Spur 1 und 5: heterozygot (AC), Spur 2 bis 4 und 7: homozygot (AA), Spur 6: homozygot (CC).

Tab. 3-4: Ergebnisse der Assoziationsstudie des SNP rs324420 in 985 adipösen Erwachsenen, sowie unter- und normalgewichtige Probanden.

Studiengruppe	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	CC	AC	AA	C	A
adipöse Erwachsene n = 985	620 (62,9 %)	334 (33,9 %)	31 (3,1 %)	1574 (79,9 %)	396 (20,1 %)
Untergewichtige Kontrollen n = 410	266 (64,9 %)	125 (30,5 %)	19 (4,6 %)	657 (80,1 %)	163 (19,9 %)
nominaler p-Wert	0,92			0,89	
adipöse Erwachsene n = 985	620 (62,9 %)	334 (33,9 %)	31 (3,1 %)	1574 (79,9 %)	396 (20,1 %)
normalgewichtige Kontrollen n = 178	109 (61,2 %)	61 (34,3 %)	8 (4,5 %)	279 (78,4 %)	77 (21,6 %)
nominaler p-Wert	0,51			0,51	
adipöse Erwachsene n = 985	620 (62,9 %)	334 (33,9 %)	31 (3,1 %)	1574 (79,9 %)	396 (20,1 %)
alle nicht-adipösen Kontrollen n = 588	375 (63,8 %)	186 (31,6 %)	27 (4,6 %)	936 (79,6 %)	240 (20,4 %)
nominaler p-Wert	0,85			0,84	

3.6 Analysen der Exons 2, 5, 6, 9, 10, 13 und 14

Der Mutationsscreen des Gens der Fettsäureamidhydrolase sowie die anschließenden Assoziationsstudien sind in Zusammenarbeit mit Frau Jophia Carri erfolgt, die in ihrer Dissertation ausführlich auf die Ergebnisse des Mutationsscreens der Exons 2, 5, 6, 9, 10, 13 und 14 eingeht. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die dort aufgeführten Resultate gegeben werden.

3.6.1 Mutationsscreen der Exons 2, 5, 6, 9, 10, 13 und 14

Im Mutationsscreen der oben genannten Exons konnten vier neue Varianten gefunden werden. Davon waren zwei im fünften Exon lokalisiert. Für jede dieser beiden Varianten fand sich im Screening-Kollektiv genau ein heterozygoter Proband. Die beiden Mutationen in Exon 5 entstehen durch einem Austausch von Cytosin durch Thymin (c.612C>T oder Thr204Thr) bzw. von Cytosin zu Guanin (c.690C>G oder Ser230Ser). In beiden Fällen kommt es zu keinem Aminosäureaustausch. Eine weitere neue Variante konnte im sechsten Exon detektiert werden. Hier ist bei vier Probanden je ein Nukleotid Guanin durch ein Adenin (c.822G>A oder Glu274Glu) ersetzt worden. Auch dieser Austausch führt zu keiner veränderten Aminosäuresequenz. Er hat inzwischen die Nummer rs41305628 zugewiesen bekommen. Als vierte Variante wurde im zwölften Intron ein Cytosin durch ein Thymin ausgetauscht (IVS12-5C>T). Es konnten 13 heterozygote Probanden als Träger dieser Variante gefunden werden.

Tab. 3-5: Neu detektierte Varianten im Mutationsscreen der Exons 2, 5, 6, 9, 10, 13 und 14 des *FAAH*-Gens.

<u>Lokalisation</u>	<u>SNP</u>	<u>absolute Häufigkeiten</u>	<u>relative Häufigkeiten</u>	<u>Allelfrequenz</u>	<u>Screening-methode</u>
Exon 5	c.612C>T (Thr204Thr)	1 x CT 91 x CC	1 % CT 99 % CC	C/T = 0,995/0,005	SSCP
Exon 5	c.690C>G (Ser230Ser)	1 x CG 91 x CC	1 % CG 99 % CC	C/G = 0,995/0,005	SSCP
Exon 6	c.822G>A (Glu274Glu) (rs41305628)	4 x AG 88 x GG	4 % AG 96 % GG	G/A = 0,98/0,02	SSCP
Intron 12	IVS12-5C>T	13 x CT 79 x CC	14 % CT 86 % CC	C/T = 0,924/0,076	SSCP

3.6.2 Transmissionsdisequilibriumtests für c.822G>A und IVS12-5C>T

Zwei der im Mutationsscreen der Exons 2, 5, 6, 9, 10, 13 und 14 gefundenen Varianten waren monomorph und eigneten sich somit nicht für weitergehende Assoziationsstudien. Der Polymorphismus in Exon 6 (rs41305628) wurde ebenso wie der neu detektierte SNP im Intron 12 (IVS12-5C>T) in einem Kollektiv aus 260 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie ihren Eltern genotypisiert. Dies ermöglichte auch hier die Berechnung des Transmissionsungleichgewichts (s. Tab.3-6). c.882G>A zeigte bei einer häufigeren Transmission des G-Allels einen

nominalen p-Wert von 0,01. Eindeutig nicht signifikant erwies sich für den neu gefundenen SNP im Intron 12 die etwas häufigere Transmission des C-Allels mit einem p-Wert von 0,37.

Tab. 3-6: Ergebnisse des TDTs für rs41305628 im sechsten Exon und IVS12-5C>T im zwölften Intron des FAAH-Gens.

<u>TDT</u>	<u>c.822G>A (rs41305628)</u>	<u>IVS12-5C>T</u>
häufiger transmittiertes Allel	G	C
Transmittiert / nicht transmittiert	31/14	54/45
Transmissionsrate [%]	68,9	54,5
Chi-Quadrat (χ^2)	6,42	0,82
p-Wert (nominal)	0,01	0,37

3.7 Nachfolgende Arbeiten

Nach Abschluss dieser Arbeit sind in der Arbeitsgruppe noch weitergehende Untersuchungen des Gens der Fettsäureamidhydrolase erfolgt, die im Nachstehenden kurz dargestellt werden sollen. Zum einen wurde für den Polymorphismus IVS1+22G>A, der im TDT einen nominalen p-Wert von 0,03 gezeigt hatte, das Kollektiv auf 502 Trios erweitert. Dadurch ergab sich ein nominaler p-Wert von 0,133. Zum anderen wurde das Kollektiv für die Genotypisierung des SNP rs41305628 (c.822G>A) auf 517 Trios erweitert. Dies hatte zur Folge, dass der initiale nominale p-Wert von 0,01 nun bei 0,0833 lag.

Tab. 3-7: Tabelle von SNPs im FAAH-Gen mit ihren, falls vorhanden, mRNA-, die Aminosäure-(AS) und Codon-Position.

<u>Lokalisation</u>	<u>SNP</u>	<u>mRNA Position</u>	<u>AS-Austausch</u>	<u>Codon Position</u>
Intron 1	IVS1+22G>A	248	-	-
Exon 3	rs324420	418	Pro129Thr	1
Intron 6	rs41309147	820	-	-
Exon 7	rs324419	930	Cys299Cys	3
3' Bereich	rs2295632	-	-	-

Des Weiteren wurde in einer Studiengruppe bestehend aus 8.491 (4250 männlichen) Individuen des populationsbasierten KORA-Kollektivs (mittleres Alter $49,3 \pm 27,12$ Jahre und mittlerer BMI $27,12 \pm 4,59$ kg/m²) die SNPs rs324420 in Exon 3 und rs2295632 im 3' Bereich mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie genotypisiert. Das KORA-Kollektiv (Kooperative Gesundheitsforschung im Raum Augsburg) stellt eine repräsentative Studiengruppe der Bevölkerung von 25 bis 74 Jahren der Stadt und der Umgebung von Augsburg dar. Es zeigte sich keine Assoziation der beiden SNPs mit Adipositas im Erwachsenenalter (p-Wert 0,91 für rs324420 und 0,71 für rs2295632) (Muller *et al.*, 2010).

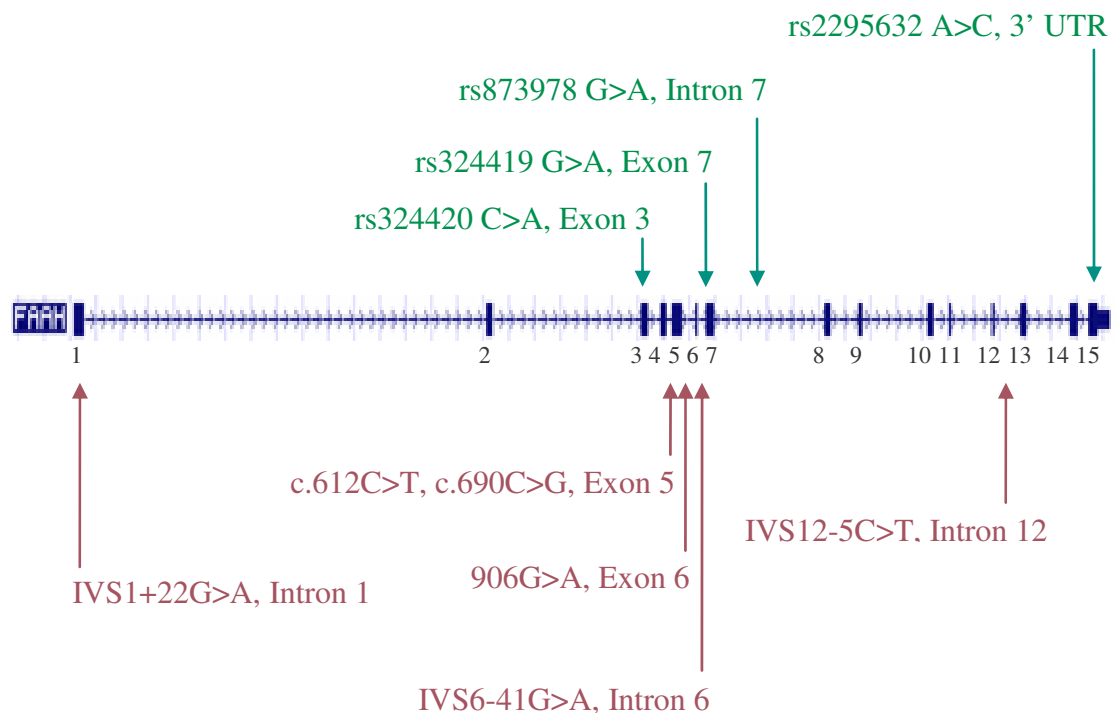


Abb. 3-0-13: Schematische Darstellung von *FAAH*, seinen Exons (durchnummeriert als blaue Kästen), untersuchten bekannten (obere Reihe) und neu detektierten (untere Reihe) Polymorphismen.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine mögliche Assoziation verschiedener Allele des Enzyms Fettsäureamidhydrolase mit frühmanifestester Adipositas und Adipositas im Erwachsenenalter zu analysieren. Bei dem vorliegenden bislang ersten beschriebenen Mutationsscreen im *FAAH*-Gen wurde nach Mutationen bzw. Polymorphismen gesucht, die an der Entwicklung einer Adipositas beteiligt sein könnten. Für das Mutationsscreening wurden extrem adipöse Kinder und Jugendliche herangezogen. Dabei wurden diejenigen Probanden ausgewählt, die in Vorarbeiten am stärksten zu einem Transmissionsungleichgewicht des SNPs rs2295632 im 3'-Bereich des *FAAH*-Gens beigetragen hatten. Um Aussagen über die Relevanz von zwei im *FAAH*-Gen detektierten SNPs zu erlangen, wurden zwei Assoziationsstudien, eine an adipösen Kindern und Jugendlichen sowie deren Eltern und eine an einer davon unabhängigen Studiengruppen aus adipösen Erwachsenen sowie über- und normalgewichtigen Studenten, durchgeführt.

Im Folgenden werden zuerst die Auswahl der Studienkollektive und der für die Mutationssuche und die Genotypisierung der SNPs verwendeten Methoden erörtert. Anschließend folgt eine Diskussion der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Daten hinsichtlich der Einschätzung ihrer Auswirkung auf die Regulation des Körpergewichts und damit auf die Ausprägung des adipösen Phänotyps.

4.1 Auswahl der Studienkollektive

Das für die Analyse des *FAAH*-Gens verwendete Studienkollektiv setzt sich aus extrem adipösen Kindern und Jugendlichen zusammen, deren mittleres Alter bei 14 Jahren lag. Es wird angenommen, dass bei frühmanifestester Adipositas, im Gegensatz zur Adipositasmanifestation im Erwachsenenalter, die genetische Prädisposition bei der Phänotypausprägung einen stärkeren Einfluss hat als Umweltfaktoren (Pietilainen *et al.*, 2001). Zudem steigt die Wahrscheinlichkeit des Fortbestehens einer bereits im Kindes- und Jugendalter vorliegenden Adipositas bis ins Erwachsenenalter sowohl mit dem Ausprägungsgrad der Adipositas als auch bei Vorkommen einer Adipositas der Eltern (Whitaker *et al.*, 1997). In dem verwendeten Trio-Studienkollektiv hatten etwa 80 % der rekrutierten Kinder und Jugendlichen einen BMI > 99. Perzentile und waren damit extrem adipös. Ein mittlerer BMI der Eltern von etwa 30 kg/m² zeigt, dass auch hier meist Übergewicht bzw. eine Adipositas vorlag. Somit ist die Vorhersagekraft des aktuellen Gewichts der adipösen Kinder und Jugendlichen für das Gewicht im Erwachsenenalter sehr hoch. Aus diesem Grund eignet sich dieses Studienkollektiv besonders zur Detektion von genetischen Varianten, die zur Ausprägung des adipösen Phänotyps prädisponieren. Für das Mutationsscreening wurde aus diesem Kollektiv anhand

von Voruntersuchungen eine Untergruppe gebildet. Dabei wurden diejenigen Probanden ausgewählt, die den größten Einfluss auf das in Vorarbeiten beobachtete Transmissionsungleichgewicht des G-Allels am SNP rs2295632 hatten. Folglich handelt es sich hier um ein angereichertes Kollektiv, in dem das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht nicht zutrifft. Grund für dieses Vorgehen war mit einem relativ kleinen Kollektiv eine möglichst hohe Anzahl an relevanten Mutationen zu detektieren. Diese sollten dann in größeren Kollektiven auf ihre Relevanz hin untersucht werden. In allen anderen unabhängigen Studiengruppen war das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erfüllt ($p > 0,05$).

Um eine falsch positive Assoziation auszuschließen, sollten weitere Assoziationsanalysen mit unabhängigen Studiengruppen durchgeführt werden. Dies erfolgte in der vorliegenden Arbeit an adipösen deutschen Erwachsenen, die einen BMI größer oder gleich 30 kg/m^2 hatten. Neben den „Fällen“ (adipöse Probanden) wurden auch Kontroll-Personen eingesetzt. Die Studiengruppe der Kontroll-Probanden setzte sich aus erwachsenen, unter- und normalgewichtigen Personen zusammen. Dadurch konnte das Risiko minimiert werden, dass diese im weiteren Verlauf eine Adipositas entwickeln. Eine Kontrollgruppe sollte sich idealerweise nur in einem Merkmal – dem zu untersuchenden Phänotyp Körpergewicht – von den Fällen unterscheiden. Dies wurde u. a. durch Ausschluss von Krankheiten (z. B. Diabetes mellitus) oder Verhaltensweisen, die das Körpergewicht beeinflussen können (z. B. starker Zigarettenkonsum), erzielt. Des Weiteren wurde ein zweites unabhängiges, populationsbezogenes Kollektiv (KORA-Studiengruppe) zur Verifizierung der Ergebnisse genotypisiert.

Die Durchführung einer familienbasierten Assoziationsstudie – hier ein TDT – gibt eine zusätzliche Möglichkeit, sehr zuverlässig falsch positive Assoziationen auszuschließen (Spielman *et al.*, 1993). Für den TDT sind Trios erforderlich, d. h. die Eltern der Indexprobanden müssen zusätzlich verfügbar sein. Dieser Test fand Anwendung sowohl in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, die als Grundlage der Erstellung des Screening-Kollektivs dienten, als auch in der Genotypisierung des SNPs IVS1+22G>A. Dabei ist zu berücksichtigen, dass das Screening-Kollektiv eine Untergruppe der adipösen Indexprobanden der Trio-Studiengruppe darstellt. Somit handelt es sich nicht um zwei voneinander unabhängige Kollektive.

4.2 Methoden zur Mutationsdetektion

4.2.1 PCR

Die PCR (s. u. 3.2) ist eine schnelle, einfache, sensitive und stabile Methode zur Amplifizierung von Ziel-DNA (Strachan und Read 1999). Die Qualität der PCR ist die entscheidende Grundlage

für die Detektierung unbekannter Sequenzvarianten bzw. die Genotypisierung von SNPs. Die Spezifität der DNA-Amplifizierung durch die PCR ist vor allem abhängig von der Bindung der Oligonukleotide an die Sequenz der Ausgangs-DNA (Strachan und Read 1999). Aus diesem Grund sollte bei der Generierung der Oligonukleotide und bei der Optimierung der PCR sehr sorgfältig gearbeitet werden. Ziel bei der Optimierung der PCR ist es, eine hohe Ausbeute des Amplifikats sowie einen möglichst geringen Anteil an unspezifischen PCR-Produkten aufgrund der Bindung der Oligonukleotide an Sequenzen, die nicht der Ziel-DNA-Sequenz entsprechen, zu erzielen.

Die Nachteile der PCR sind eine erforderliche Information zur Ziel-Sequenz, eine kurze Länge der amplifizierbaren Sequenz, eine limitierte Produktmenge und eine mangelnde Wiedergabetreue (Strachan und Read 1999). Die Sequenz des *FAAH*-Locus war verfügbar (genomische DNA: NM 001441). Für das Mutationsscreening des *FAAH* wurde das Gen mittels mehrerer PCR-Fragmente, die die Bereiche der Exons abdeckten, amplifiziert. Die Produktmenge war für die Methoden der SSCP und der dHPLC zur Mutationssuche ausreichend. Fehlerhaft eingebaute Basen können in der dHPLC oder SSCP irrtümlich als eine Sequenzvariante detektiert werden. Aus diesem Grund erfolgte bei der Identifizierung einer neuen Sequenzvariante mittels SSCP oder dHPLC immer eine wiederholte PCR und Analyse. Die Wahrscheinlichkeit für einen Polymerase-Fehler an der gleichen Position ist sehr gering. Zum Ausschluss einer „falschen“ Sequenzvariante wurden alle neu identifizierte Sequenzvarianten durch alternative Methoden wie die Sequenzierung, PCR-RFLP oder Tetra-Primer ARMS-PCR verifiziert. Aus diesem Grund können Polymerase-Fehler bei allen gefunden Sequenzvarianten ausgeschlossen werden. Für drei Polymorphismen waren die Genotypen aufgrund von Vorarbeiten bekannt. Aus diesem Grund erfolgte neben dem Nachweis über die Sequenzierung kein zusätzliches Verfahren zur Bestätigung.

Für die Durchführung von Assoziationsstudien von SNPs ist eine möglichst geringe Fehlerrate bei der Genotypisierung mittels PCR-basierter Methoden wie die PCR-RFLP und Tetra-Primer ARMS-PCR besonders wichtig, um eine „falsche“ Assoziation bzw. das Nicht-Auffinden einer vorhandenen Assoziation zu vermeiden. Eine zusätzliche Verminderung der Fehlerrate erfolgte jeweils über eine zweite unabhängige Auswertung durch einen zweiten unabhängigen Mitarbeiter. Zusätzlich erleichterte ein Mitführen von DNAs mit bekannten Genotypen in jeder „PCR-Platte“ eine genaue Auswertung.

Eine zusätzliche Kontrolle der Genauigkeit der ermittelten Genotypen für die Assoziationsstudien ermöglichte die Durchführung des TDTs. Dieser bot neben dem Nachweis von Assoziationen auch die Möglichkeit zu überprüfen, ob die Genotypen der adipösen Kinder und Jugendlichen korrekt ermittelt wurden. Für den TDT wurden zusätzlich zu den adipösen Indexprobanden jeweils beide Eltern genotypisiert, deren Allele entsprechend den Mendelschen Gesetzen verteilt sein müssen.

Falls die erfassten Allele von Kindern und deren Eltern nicht zusammenpassten, konnte eine Wiederholung der Genotypisierung einen eventuell ungenau ausgewerteten Genotyp oder in vereinzelt Fällen einen nicht zum Kind passenden Vater aufdecken. Bei unklarer Vaterschaft flossen die betreffenden Familien nicht in die Analysen ein.

4.2.2 Methoden zur Detektion unbekannter Sequenzvarianten

Es existieren zahlreiche Methoden zur Detektion unbekannter Sequenzvarianten, wobei die Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP) und die Sequenzierung die bisher am häufigsten verwendeten Methoden darstellten.

4.2.2.1 SSCP

Die SSCP-Analyse ist einfach, erfordert nur eine preiswerte Ausstattung, ist sensitiv genug für Fragmente bis zu 200 bp, ermöglicht aber nicht die Identifizierung der Art und der Position der detektierten Varianten (Sheffield *et al.*, 1993). Die Sensitivität der SSCP ist stark von den Versuchsbedingungen abhängig und kann u. a. durch eine Analyse bei zwei unterschiedlichen Temperaturen erhöht werden. Aus diesem Grund erfolgte das Mutationsscreening der kodierenden Sequenz des FAAH-Gens sowohl bei 4 °C in der Kühlkammer als auch bei Raumtemperatur.

4.2.2.2 dHPLC

Die Methode der dHPLC beruht auf der veränderten Verweildauer von Heteroduplices an der HPLC-Säule. Den Heteroduplices liegen heterozygote Formen von Mutationen zugrunde. Die Heteroduplices werden gebildet, indem die zu analysierenden PCR-Produkte durch Erhitzen denaturiert und anschließend langsam abgekühlt werden. Für die Detektion von homozygoten Mutationen muss den zu analysierenden PCR-Produkten vor der Analyse Wildtyp-DNA zugesetzt werden. Die dHPLC ermöglicht schnelle Analysen und damit ein Medium-throughput-Screening von umfangreichen Stichproben. Sie erfordert jedoch eine teure Ausstattung und ermittelt, wie die SSCP, nicht die Position der Sequenzvarianten (Strachan und Read 1999).

4.2.2.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung ist im Gegensatz zur SSCP-Analyse eine teure Methode des Mutationsscreenings, bei der alle Sequenzveränderungen sowie deren Natur und Position detektierbar sind (Strachan und Read 1999). Aus diesem Grund wurde diese Methode ausgewählt,

um diejenigen Proben mit auffälligem SSCP-Muster bzw. mit von den Wildtypproben abweichenden dHPLC-Graphen zu sequenzieren und die Varianten bzw. SNPs zu bestätigen und genauer zu charakterisieren. Ebenso wurde jeweils eine Wildtyp-Probe sequenziert, um sicherzustellen, dass das beabsichtigte Fragment des *FAAH* amplifiziert wurde.

4.3 Das Kandidatengen Fettsäureamidhydrolase

4.3.1 SNP IVS1+22G>A im ersten Intron

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte für den SNP IVS1+22G>A im ersten Intron eine nominale Evidenz für Adipositas bei übergewichtigen deutschen Kindern und Jugendlichen sowie ihren Eltern aufgezeigt werden (p-Wert 0,03). Dies beruhte auf einer häufigeren Transmission des G-Allels von den Eltern an initial 259 Indexpatienten. Da die 1-bp-Deletion im Intron und außerhalb des für den Splice-Vorgang relevanten Bereichs liegt, ist davon auszugehen, dass diese Mutation direkt keinen Einfluss auf die Pathogenese von Adipositas hat. Die Mutation könnte aber in einem Kopplungsungleichgewicht mit einer funktionsrelevanten Mutation liegen. In dem untersuchten Genabschnitt fand sich jedoch keine weitere Sequenzvariante, die mit der genannten im Kopplungsungleichgewicht lag. Eine Erweiterung des Kollektivs auf 502 adipöse Kinder und Jugendliche sowie den zugehörigen Eltern im Rahmen von Nachfolgearbeiten konnte die nominale Evidenz für Adipositas nicht bestätigen (p-Wert 0,133). Somit kann man vermuten, dass die initialen Ergebnisse falsch positiv waren und keine Assoziation des SNP IVS1+22G>A mit Adipositas vorliegt.

4.3.2 SNP rs324420 im dritten Exon

Eine überzufällig häufige Transmission des C-Allels (p-Wert: 0,02) zeigten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe für den SNP rs324420 in einem Kollektiv bestehend aus 364 Trios (364 adipösen Kindern und Jugendlichen sowie ihren Eltern) und 235 Quartetten (501 adipösen Kindern und Jugendlichen sowie ihren Eltern). Diese nominale Evidenz für eine Assoziation mit Adipositas konnte in einem unabhängigen Kollektiv aus 985 adipösen Erwachsenen sowie 588 normal- und untergewichtigen Kontrollen nicht bestätigt werden (p-Wert: 0,92). Die Genotypisierung des populationsbezogenen KORA-Kollektivs wies ebenfalls keine Assoziation des SNPs rs324420 mit Adipositas nach. Insgesamt konnte in Vorarbeiten zwar eine nominale Evidenz einer Assoziation des C-Allels, also der Prolin-Variante, mit frühmanifesten, extremer Adipositas aufgezeigt werden. Eine Assoziation der Variante mit Adipositas im Erwachsenenalter konnte jedoch weder im Rahmen dieser Arbeit noch in Nacharbeiten der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden.

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen ist die Datenlage vorangegangener Studien anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls keine eindeutige Assoziation nachweisen konnten. Sipe *et al.* fanden 2005 zwar eine signifikante Assoziation des Threonin-Allels (A-Allel) mit Adipositas bei Erwachsenen, jedoch nur in der europäischen bzw. afrikanischen Untergruppe. Die Gruppe der Asiaten wies bei den Adipösen hingegen etwas häufiger, aber nicht signifikant, das C-Allel auf (Sipe *et al.*, 2005). Ähnliche Ergebnisse erzielten Jensen und Mitarbeiter 2007. Sie fanden in einer Studiengruppe aus adipösen, dänischen Erwachsenen im Vergleich zu Normalgewichtigen häufiger das A-Allel. Insgesamt konnten sie jedoch keine signifikante Assoziation der Pro129Thr-Variante von *FAAH* mit Adipositas nachweisen (Jensen *et al.*, 2007). Die in Vorarbeiten in einem Kollektiv aus adipösen Kindern und Jugendlichen beobachtete nominale Assoziation wurde für das C-Allel, und nicht wie bei Sipe für das A-Allel beschrieben. Eine funktionelle Studie zeigte für die Prolin-Variante (A-Allel) eine verminderte Aktivität und Expression des Enzyms *FAAH* (Engeli *et al.*, 2005). Diese Beobachtungen scheinen die Ergebnisse von Sipe und Mitarbeitern zu untermauern. Da aber auch Sipe *et al.* nur in zwei der drei Untergruppen ein signifikantes Ergebnis nachweisen konnte, muss bei der Datenlage und den widersprüchlichen Ergebnisse verschiedener Studien insgesamt davon ausgegangen werden, dass die Pro129Thr-Variante von *FAAH* keinen größeren Einfluss auf die Entstehung von Adipositas hat. In drei unabhängigen Kollektiven konnte kein signifikantes Ergebnis erzielt werden.

Genetische Einflüsse auf das Körpergewicht variieren je nach Lebensalter. Während des ganzen Lebens sind nicht anhaltend die gleichen Faktoren wirksam. Zum Beispiel sind im Alter von 48 bzw. 63 Jahren nur noch 40 % der genetischen Einflussfaktoren wirksam, die den BMI in einem Alter von 20 Jahren regulieren (Fabsitz *et al.*, 1992). Dies könnte eine Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse bei Kinder und Erwachsenen sein. Vorarbeiten zeigen eine nominale, nicht für multiples Testen korrigierte Assoziation des SNPs rs324420 mit frühmanifeste Adipositas. Es sind jedoch weitere Studien in größeren Kollektiven notwendig, um die Hypothese zu untermauern bzw. zu entkräften.

4.3.3 SNP rs41309147 im Intron 6 und rs324419 in Exon 7

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ist der SNP rs324419 in 364 Trios und 235 Quartetten genotypisiert worden. Er zeigte im Transmissionsungleichgewichtstest ein p-Wert von 0,18 und somit keine signifikante Assoziation mit Adipositas. In unserem Screening-Kollektiv konnte der Polymorphismus entsprechend den Vorbefunden bei 22 der adipösen Kinder bestätigt werden. Bei 15 von ihnen konnte ein weiterer intronischer Polymorphismus (rs41309147) gefunden werden, der bei den übrigen Probanden im Kollektiv nicht nachweisbar war. Da die beiden Polymorphismen scheinbar im Kopplungsungleichgewicht lagen und bereits der SNP rs324419 eindeutig nicht

signifikant war, wurde die neu gefundene Variante nicht weiter untersucht. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese beiden SNPs keinen großen Einfluss auf die Entstehung von Adipositas haben.

4.3.4 SNP rs2295632 im 3'Bereich

Der SNP rs2295632 wurde ebenso wie die bereits oben beschriebenen Polymorphismen rs324420 und rs324419 in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe untersucht. In 364 Trios und 235 Quartetten fiel eine überzufällig häufige Transmission des G-Allels auf (nominaler p-Wert: 0,03). Aus diesem Grund trug der SNP maßgeblich zur Erstellung des Screening-Kollektivs bei. Hier konnte der Polymorphismus mittels SSCP bei 18 homozygoten und 74 heterozygoten Probanden bestätigt werden. Eine Genotypisierung im populationsbezogenen KORA-Kollektiv erbrachte keinen Hinweis auf eine Assoziation des SNPs rs2295632 mit Adipositas im Erwachsenenalter. Insgesamt konnte zwar eine nominale Assoziation des SNPs rs2295632 mit frühmanifeste Adipositas aufgezeigt werden, es erfolgte jedoch keine Korrektur für multiples Testen. Ob die Variante die Pathogenese von Adipositas beeinflusst, müssen weitere Studien, vor allem an Kindern und Jugendlichen, zeigen.

4.3.5 Zusammenfassende Beurteilung

Wichtig in der Regulation der Nahrungsaufnahme sind die Interaktion und das Gleichgewicht von gebildeten anorexigenen und orexigenen Hormonen. Gerät das System in eine Imbalance, kann daraus eine Störung des Essverhaltens und somit eine Gewichtszunahme (Adipositas) oder ein Gewichtsverlust entstehen. FAAH, ein degradierendes Enzym orexigener Transmitter, ist aufgrund seiner Funktion ein denkbarer Kandidat, um bei gestörter Funktion das System aus dem Gleichgewicht zu bringen. Vorarbeiten zeigten eine nominale Assoziation zweier SNPs (rs324420 und rs2295632) im *FAAH*-Gen mit frühmanifeste, extremer Adipositas. Deshalb war das Enzym Gegenstand eines Mutationsscreens und anschließender Assoziationsstudien. Für die dabei neu gefundenen Varianten im *FAAH*-Gen konnte in größeren Kollektiven keine signifikante Assoziation mit Adipositas nachgewiesen werden. Rs324420 zeigte in zwei voneinander unabhängigen Kollektiven keine Assoziation mit Adipositas im Erwachsenenalter, ebenso wie der SNP rs2295632. Insgesamt konnte eine nominale Evidenz für eine Assoziation der SNPs rs324420 und rs2295632 mit frühmanifeste Adipositas, jedoch nicht für Adipositas im Erwachsenenalter nachgewiesen werden. Somit scheint das Enzym FAAH in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Studiengruppen keine größere Rolle in der Ätiologie von Adipositas, zumindest im Erwachsenenalter, zu spielen. Um den Einfluss im Kindesalter besser beurteilen zu können, sind weitere Studien nötig.

5 Zusammenfassung

Weltweit ist die Adipositasprävalenz epidemieartig angestiegen. In Deutschland sind bereits 15 % der 3- bis 17-Jährigen übergewichtig und die Folgen sowohl auf somatischer als auch psychosozialer Ebene werden weiter zunehmen. Die komplexe, systemische Stoffwechselstörung ist durch übermäßige Vermehrung des Körperfetts gekennzeichnet. Der weltweite Anstieg begründet sich durch veränderte Umweltfaktoren, wie Ernährungs- und Bewegungsverhalten, auf der Grundlage genetischer Prädisposition. Diese erbliche Anfälligkeit resultiert aus einem Zusammenspiel aller Allele eines Individuums, die Einfluss auf Energiezufuhr, -aufnahme und -verbrauch haben. Ein möglicher Faktor in diesem Zusammenspiel ist die Fettsäureamidhydrolase, die auf eine mögliche Relevanz bei der Entstehung von Adipositas hin untersucht wurde. In den letzten Jahrzehnten konnten anekdotische Berichte, dass Cannabis Hunger stimuliert, wissenschaftlich bestätigt und mit Entdeckung des Endocannabinoidsystems physiologisch erklärt werden. Endocannabinoide kontrollieren sowohl die periphere Lipogenese als auch zentrale Regelkreise der Nahrungsaufnahme. Ein sie degradierendes Enzym ist, wie in Tiermodellen und humanen Studien gezeigt werden konnte, die Fettsäureamidhydrolase (FAAH).

In diesem ersten bislang beschriebenen Mutationsscreen wurden im Rahmen dieser Dissertation die Exons 1, 3, 4, 7, 8, 11, 12 und 15 des *FAAH*-Gens in einem Kollektiv aus 92 adipösen Kindern und Jugendlichen mittels Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCP) sowie denaturierender Hochdruckflüssigkeitschromatographie (dHPLC) gescreent. Innerhalb dieser Sequenz und der angrenzenden intronischen Bereiche konnten drei bereits bekannte SNPs (rs324420 in Exon 3, rs324419 in Exon 7 und rs2295632 im 3' Bereich) sowie zwei zu der Zeit der praktischen Durchführung dieser Arbeit neue Varianten (IVS1+22G>A im ersten Intron und IVS6-41G>A (mittlerweile in der Datenbank als rs41309147) im sechsten Intron) identifiziert werden. Der SNP rs324420 in Exon 3 wurde aufgrund von signifikanten Ergebnissen (nominaler p-Wert 0,02) in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe in einem unabhängigen Kollektiv aus 985 adipösen Erwachsenen sowie 588 normal- und untergewichtigen Kontrollen mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-PCR (RFLP-PCR) genotypisiert. In dieser Arbeit konnte keine signifikante Assoziation des SNPs rs324420 mit Adipositas nachgewiesen werden (p-Wert 0,84). Die neu gefundene Variante im ersten Intron wurde in einem Kollektiv aus 259 adipösen Kindern und Jugendlichen sowie ihren Eltern ebenfalls mittels RFLP-PCR genotypisiert. Es wurde eine überzufällig häufige Transmission des A-Allels von den Eltern an ihre Kinder festgestellt (p-Wert: 0,03). Folgearbeiten der Arbeitsgruppe, in der das Kollektiv auf 502 adipöse Kinder und Jugendliche vergrößert wurde, zeigten einen nicht signifikanten p-Wert von 0,133. Insgesamt konnte in Vorarbeiten eine nominale Assoziation des SNPs rs324420 mit frühmanifestester Adipositas im Kindes- und Jugendalter aufgezeigt werden, die sich in dieser Arbeit für das Erwachsenenalter nicht bestätigen ließ. Die übrigen SNPs zeigten keine signifikante Assoziation mit Adipositas.

6 Literaturverzeichnis

1. Aberle, J., Fedderwitz, I., Klages, N., George, E., Beil, F.U. (2007):
Genetic variation in two proteins of the endocannabinoid system and their influence on body mass index and metabolism under low fat diet.
Horm Metab Res. 39, 395-397.

2. Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes und Jugendalter
http://www.a-g-a.de/aga_content.html

3. Barlow, S.E., Dietz, W.H. (1998):
Obesity evaluation and treatment: Expert Committee recommendations. The Maternal and Child Health Bureau, Health Resources and Services Administration and the Department of Health and Human Services.
Pediatrics. 102, E29.

4. Bortz, J. (2005):
Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler. 6. Auflage.
Heidelberg: Springer Medizin Verlag.

5. Bouchard, C., Perusse, L. (1993):
Genetic aspects of obesity.
Ann N Y Acad Sci. 699, 26-35.

6. Bracey, M.H., Hanson, M.A., Masuda, K.R., Stevens, R.C., Cravatt, B.F. (2002):
Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling.
Science. 298, 1793-1796.

7. Budowle, B., Chakraborty, R., Giusti, A.M., Eisenberg, A.J., Allen, R.C. (1991):
Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE.
Am J Hum Genet. 48, 137-144.

8. Chiang, K.P., Gerber, A.L., Sipe, J.C., Cravatt, B.F. (2004):
Reduced cellular expression and activity of the P129T mutant of human fatty acid amide hydrolase: evidence for a link between defects in the endocannabinoid system and problem drug use.
Hum Mol Genet. 13, 2113-2119.

9. Christensen, R., Kristensen, P.K., Bartels, E.M., Bliddal, H., Astrup, A.V. (2007):
A meta-analysis of the efficacy and safety of the anti-obesity agent Rimonabant.
Ugeskr Laeger. 169, 4360-4363.

10. Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gormelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M., Basdevant, A., Bougneres, P., Lebouc, Y., Froguel, P., Guy-Grand, B. (1998):
A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction.
Nature. 392, 398-401.

11. Cone, R.D., Lu, D., Koppula, S., Vage, D.I., Klungland, H., Boston, B., Chen, W., Orth, D.N., Pouton, C., Kesterson, R.A. (1996):
The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation.
Recent Prog Horm Res. 51, 287-317; discussion 318.
12. Cota, D., Marsicano, G., Lutz, B., Vicennati, V., Stalla, G.K., Pasquali, R., Pagotto, U. (2003a):
Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake.
Int J Obes Relat Metab Disord. 27, 289-301.
13. Cota, D., Marsicano, G., Tschop, M., Grubler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thone-Reineke, C., Ortmann, S., Tomassoni, F., Cervino, C., Nisoli, E., Linthorst, A.C., Pasquali, R., Lutz, B., Stalla, G.K., Pagotto, U. (2003b):
The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis.
J Clin Invest. 112, 423-431.
14. Cravatt, B.F., Demarest, K., Patricelli, M.P., Bracey, M.H., Giang, D.K., Martin, B.R., Lichtman, A.H. (2001):
Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase.
Proc Natl Acad Sci U S A. 98, 9371-9376.
15. de Luis, D.A., Gonzalez Sagrado, M., Aller, R., Izaola, O., Conde, R., Romero, E. (2010):
C358A missense polymorphism of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) and visfatin levels in obese females.
Int J Obes (Lond). 34 (im Druck, vorzeitige Internetveröffentlichung).
16. Dietz, W.H., Robinson, T.N. (1998):
Use of the body mass index (BMI) as a measure of overweight in children and adolescents.
J Pediatr. 132, 191-193.
17. Ebbeling, C.B., Pawlak, D.B., Ludwig, D.S. (2002):
Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure.
Lancet. 360, 473-482.
18. Elder, K.A., Wolfe, B.M. (2007):
Bariatric surgery: a review of procedures and outcomes.
Gastroenterology. 132, 2253-2271.
19. Ellacott, K.L., Cone, R.D. (2004):
The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis.
Recent Prog Horm Res. 59, 395-408.
20. EMEA 2008: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/acompia/53777708en.pdf>
21. Engeli, S., Bohnke, J., Feldpausch, M., Gorzelniak, K., Janke, J., Batkai, S., Pacher, P., Harvey-White, J., Luft, F.C., Sharma, A.M., Jordan, J. (2005):
Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity.
Diabetes. 54, 2838-2843.

22. Fabsitz, R.R., Carmelli, D., Hewitt, J.K. (1992):
Evidence for independent genetic influences on obesity in middle age.
Int J Obes Relat Metab Disord. 16, 657-666.
23. Fan, Z.C., Tao, Y.X. (2009):
Functional Characterization and Pharmacological Rescue of Melanocortin-4 Receptor Mutations
Identified from Obese Patients.
J Cell Mol Med.
24. Farooqi, I.S., Jebb, S.A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C.H., Prentice, A.M.,
Hughes, I.A., McCamish, M.A., O'Rahilly, S. (1999):
Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency.
N Engl J Med. 341, 879-884.
25. Frayling, T.M., Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Freathy, R.M., Lindgren, C.M.,
Perry, J.R., Elliott, K.S., Lango, H., Rayner, N.W., Shields, B., Harries, L.W., Barrett, J.C., Ellard,
S., Groves, C.J., Knight, B., Patch, A.M., Ness, A.R., Ebrahim, S., Lawlor, D.A., Ring, S.M., Ben-
Shlomo, Y., Jarvelin, M.R., Sovio, U., Bennett, A.J., Melzer, D., Ferrucci, L., Loos, R.J., Barroso,
I., Wareham, N.J., Karpe, F., Owen, K.R., Cardon, L.R., Walker, M., Hitman, G.A., Palmer, C.N.,
Doney, A.S., Morris, A.D., Smith, G.D., Hattersley, A.T., McCarthy, M.I. (2007):
A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to
childhood and adult obesity.
Science. 316, 889-894.
26. Friede, E. (2007):
Das endogene Cannabinoidsystem: ein neuer Akteur in der Gehirn-Darm-Fett-Achse.
Cannabinoids 2, 6-14.
27. Geller, F., Reichwald, K., Dempfle, A., Illig, T., Vollmert, C., Herpertz, S., Siffert, W., Platzer,
M., Hess, C., Gudermann, T., Biebermann, H., Wichmann, H.E., Schafer, H., Hinney, A.,
Hebebrand, J. (2004):
Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity.
Am J Hum Genet. 74, 572-581.
28. Gilhuis, H.J., van Ravenswaaij, C.M., Hamel, B.J., Gabreels, F.J. (2000):
Interstitial 6q deletion with a Prader-Willi-like phenotype: a new case and review of the literature.
Eur J Paediatr Neurol. 4, 39-43.
29. Gray, D.S. (1989):
Diagnosis and prevalence of obesity.
Med Clin North Am. 73, 1-13.
30. Grompe, M. (1993):
The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids.
Nat Genet. 5, 111-117.

31. Guagnano, M.T., Manigrasso, M.R., Marinopicolì, M., Davi, G. (2007):
What do we know about obesity?
Clin Ter. 158, 261-266.
- Gunay-Aygun, M., Schwartz, S., Heeger, S., O'Riordan, M.A., Cassidy, S.B. (2001):
The changing purpose of Prader-Willi syndrome clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria.
Pediatrics. 108, E92.
32. Hebebrand, J., Hesecker, H., Himmelmann, G.W., Schäfer, H., Remschmidt, H. (1994):
Altersperzentilen für den Body Mass Index aus Daten der Nationalen Verzehrsstudie einschließlich einer Übersicht zu relevanten Einflussfaktoren.
Aktuelle Ernährungsmed. 19, 259-265.
33. Hebebrand, J., Remschmidt, H. (1995):
Body weight under genetic control.
Med Klin (Munich). 90, 403-410.
34. Hebebrand, J., Sommerlad, C., Geller, F., Gorg, T., Hinney, A. (2001):
The genetics of obesity: practical implications.
Int J Obes Relat Metab Disord. 25 Suppl 1, S10-18.
35. Hebebrand, J., Wulfhage, H., Goerg, T., Ziegler, A., Hinney, A., Barth, N., Mayer, H., Remschmidt, H. (2000):
Epidemic obesity: are genetic factors involved via increased rates of assortative mating?
Int J Obes Relat Metab Disord. 24, 345-353.
36. Helling, R.B., Goodman, H.M., Boyer, H.W. (1974):
Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis.
J Virol. 14, 1235-1244.
37. Hill, J.O., Wyatt, H.R., Reed, G.W., Peters, J.C. (2003):
Obesity and the environment: where do we go from here?
Science. 299, 853-855.
38. Hinney, A., Friedel, S., Remschmidt, H., Hebebrand, J. (2004a):
Genetic risk factors in eating disorders.
Am J Pharmacogenomics. 4, 209-223.
39. Hinney, A., Hohmann, S., Geller, F., Vogel, C., Hess, C., Wermter, A.K., Brokamp, B., Goldschmidt, H., Siegfried, W., Remschmidt, H., Schafer, H., Gudermann, T., Hebebrand, J. (2003):
Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity.
J Clin Endocrinol Metab. 88, 4258-4267.

40. Hinney, A., Lentes, K.U., Rosenkranz, K., Barth, N., Roth, H., Ziegler, A., Hennighausen, K., Coners, H., Wurmser, H., Jacob, K., Romer, G., Winnikes, U., Mayer, H., Herzog, W., Lehmkuhl, G., Poustka, F., Schmidt, M.H., Blum, W.F., Pirke, K.M., Schafer, H., Grzeschik, K.H., Remschmidt, H., Hebebrand, J. (1997):
Beta 3-adrenergic-receptor allele distributions in children, adolescents and young adults with obesity, underweight or anorexia nervosa.
Int J Obes Relat Metab Disord. 21, 224-230.
41. Hinney, A., Wermter, A.K., Friedel, S., Hinney, Ch., Remschmidt, H., Hebebrand, J.(2004b):
Genetische Faktoren der Adipositas.
Medgen. 16, 327-333.
42. Hinney, A., Schmidt, A., Nottebom, K., Heibult, O., Becker, I., Ziegler, A., Gerber, G., Sina, M., Gorg, T., Mayer, H., Siegfried, W., Fichter, M., Remschmidt, H., Hebebrand, J. (1999):
Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans.
J Clin Endocrinol Metab. 84, 1483-1486.
43. Holder, J.L., Jr., Butte, N.F., Zinn, A.R. (2000):
Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene.
Hum Mol Genet. 9, 101-108.
44. Horvath, T.L. (2003):
Endocannabinoids and the regulation of body fat: the smoke is clearing.
J Clin Invest. 112, 323-326.
45. Hoshino, S., Kimura, A., Fukuda, Y., Dohi, K., Sasazuki, T. (1992):
Polymerase chain reaction--single-strand conformation polymorphism analysis of polymorphism in DPA1 and DPB1 genes: a simple, economical, and rapid method for histocompatibility testing.
Hum Immunol. 33, 98-107.
46. Huber, C.G., Oefner, P.J., Bonn, G.K. (1993):
High-resolution liquid chromatography of oligonucleotides on nonporous alkylated styrene-divinylbenzene copolymers.
Anal Biochem. 212, 351-358.
47. Jackson, R.S., Creemers, J.W., Ohagi, S., Raffin-Sanson, M.L., Sanders, L., Montague, C.T., Hutton, J.C., O'Rahilly, S. (1997):
Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene.
Nat Genet. 16, 303-306.
48. Jensen, D.P., Andreasen, C.H., Andersen, M.K., Hansen, L., Eiberg, H., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., Hansen, T., Pedersen, O. (2007):
The functional Pro129Thr variant of the FAAH gene is not associated with various fat accumulation phenotypes in a population-based cohort of 5,801 whites.
J Mol Med. 85, 445-449.

49. Kirkham, T.C., Williams, C.M., Fezza, F., Di Marzo, V. (2002):
Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol.
Br J Pharmacol. 136, 550-557.
50. Konturek, S.J., Konturek, J.W., Pawlik, T., Brzozowski, T. (2004):
Brain-gut axis and its role in the control of food intake.
J Physiol Pharmacol. 55, 137-154.
51. Korner, J., Aronne, L.J. (2003):
The emerging science of body weight regulation and its impact on obesity treatment.
J Clin Invest. 111, 565-570.
52. Korner, J., Leibel, R.L. (2003):
To eat or not to eat - how the gut talks to the brain.
N Engl J Med. 349, 926-928.
53. Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., Gruters, A. (1998):
Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans.
Nat Genet. 19, 155-157.
54. Kurth, B.M., Schaffrath Rosario, A. (2007):
The prevalence of overweight and obese children and adolescents living in Germany. Results of the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS).
Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 50, 736-743.
55. Lander, E.S., Schork, N.J. (1994):
Genetic dissection of complex traits.
Science. 265, 2037-2048.
56. Lichtman, A.H., Cravatt, B.F. (2005):
Food for thought: endocannabinoid modulation of lipogenesis.
J Clin Invest. 115, 1130-1133.
57. Maes, H.H., Neale, M.C., Eaves, L.J. (1997):
Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity.
Behav Genet. 27, 325-351.
58. Martin, E.R., Monks, S.A., Warren, L.L., Kaplan, N.L. (2000):
A test for linkage and association in general pedigrees: the pedigree disequilibrium test.
Am J Hum Genet. 67, 146-154.
59. McKinney, M.K., Cravatt, B.F. (2005):
Structure and function of fatty acid amide hydrolase.
Annu Rev Biochem. 74, 411-432.
60. Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1988):
A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucleic Acids Res. 16, 1215.

61. Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., Cheetham, C.H., Earley, A.R., Barnett, A.H., Prins, J.B., O'Rahilly, S. (1997):
Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans.
Nature. 387, 903-908.
62. Monteleone, P., Tortorella, A., Martiadis, V., Di Filippo, C., Canestrelli, B., Maj, M. (2008):
The cDNA 385C to A missense polymorphism of the endocannabinoid degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is associated with overweight/obesity but not with binge eating disorder in overweight/obese women.
Psychoneuroendocrinology. 33, 546-550.
63. Mülhart, C. (2003):
Molekularbiologie/Genomics. 4. Auflage.
München: Elsevier GmbH Spektrum Akademischer Verlag.
64. Müller, T.D., Brönner, G., Wandolski, M., Carrie, J., Nguyen, T.T., Greene, B.H., Scherag, A., Grallert, H., Vogel, C.I., Scherag, S., Rief, W., Wichmann, H.E., Illig, T., Schaefer, H., Hebebrand, J., Hinney, A. (2010):
Mutation screen and association studies for the fatty acid amide hydrolase (FAAH) gene and early onset and adult obesity.
BMC Med Genet. 11, 2.
65. Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987):
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.
Methods Enzymol. 155, 335-350.
66. Neel, J.V., Weder, A.B., Julius, S. (1998):
Type II diabetes, essential hypertension, and obesity as "syndromes of impaired genetic homeostasis": the "thrifty genotype" hypothesis enters the 21st century.
Perspect Biol Med. 42, 44-74.
67. O'Meara, S., Riemsma, R., Shirran, L., Mather, L., ter Riet, G. (2001):
A rapid and systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of orlistat in the management of obesity.
Health Technol Assess. 5, 1-81.
68. O'Meara, S., Riemsma, R., Shirran, L., Mather, L., ter Riet, G. (2002):
The clinical effectiveness and cost-effectiveness of sibutramine in the management of obesity: a technology assessment.
Health Technol Assess. 6, 1-97.
69. Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. (1989):
Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction.
Genomics. 5, 874-879.

70. Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Batkai, S., Harvey-White, J., Mackie, K., Offertaler, L., Wang, L., Kunos, G. (2005):
Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity.
J Clin Invest. 115, 1298-1305.
71. Pietilainen, K.H., Kaprio, J., Rasanen, M., Winter, T., Rissanen, A., Rose, R.J. (2001):
Tracking of body size from birth to late adolescence: contributions of birth length, birth weight, duration of gestation, parents' body size, and twinship.
Am J Epidemiol. 154, 21-29.
72. Ristow, M., Muller-Wieland, D., Pfeiffer, A., Krone, W., Kahn, C.R. (1998):
Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation.
N Engl J Med. 339, 953-959.
73. Rodriguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Bermudez-Silva, F.J., Bilbao, A., Cippitelli, A., Navarro, M. (2005):
The endocannabinoid system: physiology and pharmacology.
Alcohol Alcohol. 40, 2-14.
74. Rolland-Cachera, M.F., Deheeger, M., Guilloud-Bataille, M., Avons, P., Patois, E., Sempe, M. (1987):
Tracking the development of adiposity from one month of age to adulthood.
Ann Hum Biol. 14, 219-229.
75. Sachs, L (1974):
Angewandte Statistik: Planung und Auswertung; Methoden und Modelle. 4.Auflage.
Heidelberg, New York: Springer Verlag Berlin.
76. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977):
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci U S A. 74, 5463-5467.
77. Schmitt, T.J., Robinson, M.L., Doyle, J. (2000):
Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Insertion & Deletion Detection on the WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System.
Omaha: Transgenomic Inc. Application Note 112.
78. Schneider, U., Seifert, J., Karst, M., Schlimme, J., Cimander, K., Muller-Vahl, K.R. (2005):
The endogenous cannabinoid system. Therapeutic implications for neurologic and psychiatric disorders.
Nervenarzt. 76, 1062, 1065-1066, 1068-1072 passim.
79. Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Seeley, R.J., Baskin, D.G. (2000):
Central nervous system control of food intake.
Nature. 404, 661-671.

80. Shaffer, J. P. (1995):
Multiple Hypothesis Testing.
Ann. Rev. Psych. 46, 561-584.
81. Sheffield, V.C., Beck, J.S., Kwitek, A.E., Sandstrom, D.W., Stone, E.M. (1993):
The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions.
Genomics. 16, 325-332.
82. Sipe, J.C., Waalen, J., Gerber, A., Beutler, E. (2005):
Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH).
Int J Obes (Lond). 29, 755-759.
83. Spielman, R.S., McGinnis, R.E., Ewens, W.J. (1993):
Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM).
Am J Hum Genet. 52, 506-516.
84. Stefan, M., Nicholls, R.D. (2004):
What have rare genetic syndromes taught us about the pathophysiology of the common forms of obesity?
Curr Diab Rep. 4, 143-150.
85. Strachan, T., Read, A.P. (1999):
Molekulare Humangenetik.
Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
86. Stunkard, A.J., Harris, J.R., Pedersen, N.L., McClearn, G.E. (1990):
The body-mass index of twins who have been reared apart.
N Engl J Med. 322, 1483-1487.
87. Taylor, P., Munson, K., Gjerde, D. (2000):
Detection of Mutations and Polymorphisms on the Wave® Nucleic Acid Fragment Analysis System.
Omaha: Transgenomic, Inc. 1998, 2000; Application Note 101.
88. Troiano, R.P., Flegal, K.M. (1998):
Overweight children and adolescents: description, epidemiology, and demographics.
Pediatrics. 101, 497-504.
89. Tsuboi, K., Takezaki, N., Ueda, N. (2007):
The N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA).
Chem Biodivers. 4, 1914-1925.
90. Van Gaal, L.F., Rissanen, A.M., Scheen, A.J., Ziegler, O., Rossner, S. (2005):
Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study.
Lancet. 365, 1389-1397.

91. Vandevoorde, S. (2008):
Overview of the chemical families of fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase inhibitors.
Curr Top Med Chem. 8, 247-267.
92. Wabitsch, M. (2004):
Obese children and adolescents in Germany. A call for action.
Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 47, 251-255.
93. Watson, P.E., Watson, I.D., Batt, R.D. (1979):
Obesity indices.
Am J Clin Nutr. 32, 736-737.
94. Whitaker, R.C., Wright, J.A., Pepe, M.S., Seidel, K.D., Dietz, W.H. (1997):
Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity.
N Engl J Med. 337, 869-873.
95. WHO 2006a: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>
96. WHO 2006b: http://www.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html
97. Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B., Bloom, S. (2005):
Appetite control.
J Endocrinol. 184, 291-318.
98. Xiao, W., Oefner, P.J. (2001):
Denaturing high-performance liquid chromatography: A review.
Hum Mutat. 17, 439-474.
99. Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A.R., Day, I.N. (2001):
An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms.
Nucleic Acids Res. 29, E88-88.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1-1: Vergleich des prozentualen Anteils der Über- und Untergewichtigen in Bevölkerungen unterschiedlich stark entwickelter Länder (modifiziert nach WHO 2002).	8
Abb. 1-2: BMI-Perzentilen (modifiziert nach Kromeyer-Hauschild <i>et al.</i> , 2001).	10
Abb. 1-3: BMI-Perzentilen für Jungen (Kurth und Schaffrath Rosario 2007).	17
Abb. 1-5: Model der Endocannabinoid-regulierten Signalwege (modifiziert nach Lichtmann und Cravatt 2005).	27
Abb. 1-6: Kristallstruktur eines FAAH-Dimers (modifiziert nach McKinney und Cravatt 2005).	31
Abb. 2-1: Bildung von Hetero- und Homoduplices nach Denaturierung und anschließendem Reannealing der Doppelhelix (modifiziert nach Transgenomic; Cheshire, UK).	51
Abb. 2-2: Temperaturabhängige Auflösung von Homoduplices und Heteroduplices mit dHPLC. (modifiziert nach Taylor <i>et al.</i> , 1998 und 2000).	52
Abb. 2-3: Schematische Darstellung der ARMS-PCR von Exon 15.3b. (modifiziert nach Ye <i>et al.</i> , 2001).	56
Abb. 2-4: Kreuztabelle zur Bestimmung der Genotyphäufigkeiten.	58
Abb. 2-5: Vierfeldertafel.	62
Abb. 3-1: Schematische Darstellung des Gens <i>FAAH</i> (ENST00000117480).	63
Abb. 3-2: SSCP-Gel (Silberfärbung) des <i>FAAH</i> SNPs rs324420.	67
Abb. 3-3: Sequenzanalyse des <i>FAAH</i> SNPs rs324420 C>A (Pro129Thr) im Exon 3 des Gens.	67
Abb. 3-4: dHPLC Typisierung des <i>FAAH</i> SNPs rs324419.	67
Abb. 3-5: Sequenzanalyse des <i>FAAH</i> SNPs rs324419 T>C (Cys>Cys) im Exon 7.	67
Abb. 3-8: SSCP-Gel (Silberfärbung) bei RT mit der Variante IVS1+22G>A des <i>FAAH</i> -Gens.	69
Abb. 3-9: Sequenzanalyse des <i>FAAH</i> SNPs IVS1+22G>A im Intron 1 des Gens.	69
Abb. 3-10: dHPLC Typisierung der <i>FAAH</i> SNPs rs41309147 und rs324419.	70
Abb. 3-11: RFLP-PCR Typisierung des <i>FAAH</i> SNPs IVS1+22G>A.	71
Abb. 3-12: RFLP-PCR Typisierung des <i>FAAH</i> SNPs rs324420.	72
Abb. 3-0-13: Schematische Darstellung von <i>FAAH</i> .	75

7.2 Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1-1: Klassifikation der Adipositas (modifiziert nach WHO 2006b).	9
Tab. 2-1: Liste der verwendeten Geräte.	35
Tab. 2-2: Liste der verwendete Chemikalien.	36
Tab. 2-3: Eingesetzte Primer für die PCRs (T_{ann} = Annealingtemperatur).	40
Tab. 2-4: Eingesetzte Restriktionsenzyme.	41
Tab. 2-5: Deskriptive Statistik der Studiengruppen.	42
Tab. 2-6: Reaktionsansatz einer Standard-PCR.	45
Tab. 2-7: PCR-Programm für einen Thermocycler.	45
Tab. 2-8: PCR-Programm der Touchdown-PCR von Exon 1.	46
Tab. 2-9: Reaktionsansatz für ein 15 %-iges Polyacrylamidgel.	48
Tab. 2-10: SSCP-Bedingungen der untersuchten Exons.	49
Tab. 2-11: Eingesetzte Restriktionsenzyme und die verschiedenen Fragmentlängen nach dem Restriktionsverdau.	55
Tab. 2-12: Tabelle der verwendeten ARMS-Oligonukleotide für Exon 15.3b (SNP rs2295632).	57
Tab. 2-13: Vierfeldertafel mit den Allelhäufigkeiten zur Berechnung des χ^2 – Wertes.	60
Tab. 3-1: Ergebnisse der Genotypisierung vier verschiedener SNPs innerhalb des FAAH-Gens.	64
Tab. 3-2: Tabelle detektierter SNPs und Varianten im FAAH-Gen in den Exons 1, 3, 4, 7, 8, 11, 12 und 15 sowie den flankierenden intronischen Bereichen .	66
Tab. 3-3: Ergebnisse der Genotypisierung und des Transmissionsungleichgewichtstests (TDT) des SNP IVS1+22G>A in Intron 1.	71
Tab. 3-4: Ergebnisse der Assoziationsstudie des SNP rs324420 in 985 adipösen Erwachsenen. sowie unter- und normalgewichtige Probanden.	72
Tab. 3-5: Neu detektierte Varianten im Mutationsscreen der Exons 2, 5, 6, 9, 10, 13 und 14 des FAAH-Gens.	73
Tab. 3-6: Ergebnisse des TDTs für rs41305628 im sechsten Exon und IVS12-5C>T im zwölften Intron des FAAH-Gens.	74
Tab. 3-7: Tabelle von SNPs im FAAH-Gen..	74

7.3 Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACC1	Acetyl-Coenzym-A Carboxylase-1
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AgRP	agouti related peptide
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
ARMS	allelspezifische Amplifikation (amplification refractory mutation system)
ARC	Nukleus arkuatus
AS	Aminosäure
BMI	body mass index
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
c	cDNA (komplementäre Desoxyribonucleinsäure)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
ca.	Circa
CB1/2	Cannabinoid-Rezeptor 1/2
CART	cocaine- and amphetamine-regulated transcript
CCK	Cholecystokinin
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CRH	corticotropin-releasing hormone
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAAH	Fettsäureamidhydrolase
FAS	Fettsäuresynthetase
G	Guanin
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
dHPLC	denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (denaturing high-performance liquid chromatography)

HOMA	Homeostasis model assessment
I	Isoleucin
K	Lysin
kDa	Kilodalton
kb	Kilobase
kg	Kilogramm
l	Liter
LHA	Lateraler Hypothalamus
M	Molar
m	Meter
MC-R	Melanokortin-Rezeptor
MCH	Melanin-konzentrierendes Hormon
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	Boten Ribonukleinsäure (messenger RNA)
MSH	Melanocyten-stimulierendes Hormon
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NPY	Neuropeptid Y
NTS	Nukleus traktus solitarii
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDT	pedigree-disequilibrium-test
PFA	perifornicalen Region
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
pmol	Picomol (Stoffmenge)
POMC	Proopiomelanocortin
Pro	Prolin
PVN	Nukleus paraventricularis
PYY	Peptid YY
q	Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms
RCLB	Red cell lysis buffer
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (restriction fragment length polymorphism)

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minutes)
RT	Raumtemperatur (22 °C)
S	Serin
sec	Sekunde
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SE-Puffer	Salzsäure-EDTA-Puffer
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single nucleotide polymorphism)
SSCP	Einzelstrang-Konformationsanalyse (single-stranded conformation polymorphism analysis)
s. u.	siehe unten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TDT	Transmissions-Ungleichgewichts-Test (transmission-disequilibrium-test)
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
TEAA	Triethylammonium-acetat
TEMED	Tetra-methyl-ethylen-diamin
Thr	Threonin
TRH	thyrotropin-releasing hormone
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit
UTR	untranslatierter Bereich
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	volume per volume
VMH	Ventromedialer Hypothalamus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
w/v	weight per volume
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
α -MSH	α -Melanozyten-stimulierendes Hormon
Δ^9 -THC	Tetrahydrocannabinol
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Anke Hinney, der Laborleiterin der Klinischen Forschergruppe, für die fortwährende Unterstützung, die stets offene Tür und Diskussionsbereitschaft.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Johannes Hebebrand, Direktor der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Universität Duisburg-Essen, herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Klinik durchzuführen.

Ebenfalls danken möchte ich Dr. Günter Brönnner für die Betreuung während meiner Doktorarbeit, für die Geduld und Hilfestellungen bei theoretischen und praktischen Fragen.

Mein Dank geht ebenso an alle im Labor tätigen Mitarbeiter der Klinischen Forschergruppe, die mir immer hilfsbereit zur Seite standen, mich bei der Durchführung der umfangreichen praktischen Tätigkeiten unterstützt und für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben.

Des Weiteren danke ich Jophia Carri für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit während der Doktorarbeit.

An Prof. Dr. Helmut Schäfer und insbesondere Thuy Trang Nguyen aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg richtet sich mein besonderer Dank für ihre zahlreichen statistischen Auswertungen und biometrischen Berechnungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund, auf die ich mich immer verlassen konnte und die mich immer unterstützt haben. Für das unermüdliche und zeitaufwendige Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit und ihre moralische Unterstützung bin ich ihnen sowie allen meinen Freunden dankbar.